Tools, Instruments, Equipments

1- loop: الناقل – أداة معدنية

Used for transfer of bacterial cells from medium to another (as colony or as drop (0.01 ml), sterilized by the flame of burner before and after using.

2. Pipette: الماصة – اداة زجاجية مدرجة باحجام مختلفة

Used for transferred cultured and uncultured broth from tube or flask to other, and placed in the can. Sterilized in autoclave.(with can).

3. Spreader: الناشر – اداة زجاجية بشكل حرف (L)

Used for spreading the bacterial cells in the surface of slide medium in Petri plate. Before using placed in alcohol and then sterilized by flame of burner (before using).

4. Swab: المسحة – اداة بشكل عصا خشبية في نهايتها قطن

Used for swabbing the bacterial cells on the surface of solid medium in Petri plate, must be placed in test tube and sterilized by Autoclave (with test tube), must be disinfectants before disposal. تستعمل لمرة واحدة فقط

5. Needles: الابرة – اداة معدنية

Used for transfer bacterial cells to a solid medium or semisolid medium by stabbing. Sterilized (before and after using) by the flame of burner.

6. Slide: الشريحة الزجاجية

Used for the examination. Placed on microscopic stages.

7. Cover – slips: غطاء الشريحة – قطعة مربعة او دائرية بلاستيكية او زجاجية

Placed on the slide, the sample will be between the cover and the slide.

8. Test tube: انابيب اختبار زجاجية او بلاستبكية باحجام مختلفة

Used to placed the broth, or slide or semisolid medium for stabbing, or placed as slant for bacteria culturing. Thy empty tubes or with uncultured broth sterilized by autoclave (15 minute), but with cultured broth by autoclave (30 minutes).

9. Petri – dish (Petri – plate) : طبق بتري (زجاجي او بلاستيكي)

Used for place the solid medium in it. Glass Petri – plate used for many time & sterilized by oven or by autoclave, sterilized plastic plates used for one time.

10. Flask: دورق مصنوع من الزجاج باحجام واشكال مختلفة
Used for place cultured or uncultured broth in it. Sterilized after plugs with cotton by autoclave.

11. Beaker: بيكر - من الزجاج باحجام مختلفة
Used for graduate the volume of liquid. Sterilized by oven.

12. Cylinder: (Graduated cylinder) الاسطوانة المدرجة- مصنوع من الزجاج
Used for graduate the volume of liquid. Sterilized by oven.

13. Washing bottle: قنينة من البلاستك مثبت في رأسها انبوبة لخروج السائل منها
Used to fill with liquids (specially distilled water) for washing and homogenizing the glass wares and washing the slide during the staining, **don't need to sterilization.**

14. Can: علبة الماصات- علبة معدنية اسطوانية تحتوي في نهايتها غطاء معدني
Used for preserved the pipettes from any contamination sterilized with pipettes by autoclave.

15. Burner:
May be gaseous or alcoholic, used for sterilize the loop, needle and other metal tools by the flame (dry heat sterilization).

16. PH Paper: ورق قياس الأس الهيدروجيني- ورق باشكال واحجام ومديات مختلفة Used know the pH of the medium or any liquid.

17. Rack: حامل الانابيب – معدني او خشبي لوضع الانابيب بشكل عامودي

18. Autoclave: المؤصدة
Equipment with high temperature, pressure and steam to sterilize the culture media and some of metal tools and glass wares.

- The temperature = 121 ^{o}C
- Pressure = 1 atm.(15 pound/ Inch^{2})
- Time = 10 – 30 minutes.

10 min. (for media with sugar)
15 min. (for uncultured media)
30 min. . (for cultured media & contaminated glass wares)
Sterilization by autoclave named (wet heat sterilization) the death of bacteria take place by protein denaturation.

19. Oven: الفرن

The sterilization is (Dry heat sterilization), the death of bacteria take place by oxidation. Used for sterilize the glas wares and some of metal tools.

Temp. = 180 ^{o}C

Time = one hour & half. كلما تزداد الحرارة يقل الوقت وبالعكس

20. Incubator: الحاظنة

Used for the availability of suitable temperature for growth of microorganisms by the place the culture media in it, for example: pathogenic bacteria grow in optimal temperature 37 ^{o}C for 18 – 24 hours (the optimum 24hr.)

21. Refrigerator: الثلاجة

Used to place the sterilized media and broth when not used **to avoid the contamination,** and also used to **preserve the bacterial cultures** for long time by preserving the growth in 4 ^{o}C.

22. Cotton plugs: السدادات القطنية

Sterilization: هي العملية التي يتم بواسطتها قتل أو إزالة للبكتيريا والفطريات والفايروسات بفعالية عالية من السطوح أو تلك الموجودة على المواد الغذائية أو الطبية أو الاوساط الزرعية المختبرية .

تصنيف التعقيم:

١- الطرق الفيزياوية :وتشمل

- **Heating:** أ– dry heat (Flame. incineration)
  ب- Wet heat (Autoclave . Boiling water. Tyndallization)
- **Radiation :** أ- **gamma ray**
  ب- **UV light ray**
  ج- **X- rays**
- **Filtration**

٢- **الطرق الكيمياوية: وتشمل التعقيم بالمواد الكيمياوية** مثل:

- Ethylene oxide
- Glautraldehyde and formaldehyde
- Hydrogen peroxide

Physical methods:

- Heat stre.

1- Dry heat: الحرارة الجافة

- **Flaming** الشعلة: use for sterilization of loop, small metals, glass objects by **Bunsen burner** or **Alcohol burner**.

Problems: there are residues (carbon) on sterilized materials. تترك المخلفات

- Incineration: used for sterilizing biohazard waste removed. هي عملية تحويل المواد إلى رماد

2- Wet heat: الحرارة الرطبة

- Boiling water: use for medical metals and glasses.

لقتل معظم البكتيريا الخضرية والفايروسات لكنها غير فعالة ضد الفطريات ومعظم البكتيريا المتبوغة.

- Tyndallization:- named by John Tandall

تتم هذه الطريقة بالخطوات الاتية:

1. Boiling for 20 min -----→ cooling -----→ incubating for 1day
2. Boiling for 20 min -----→ cooling -----→ incubating for 1day
3. Boiling for 20 min -----→ cooling -----→ incubating for 1day
4. Boiling again.

بعد عملية الغليان الاولى ومن ثم التبريد والحضن تتحول الابواغ المقاومة للحرارة الى ابواغ حساسة للحرارة ومن ثم في عملية التسخين الثانية تتحول هذه الابواغ الى الطور الخضري الحساس للحرارة ومن ثم تقتل في عملية الغليان الأخيرة.

☒ Autoclaving method:

هي الطريقة الاكثر شيوعا واستخداما في المختبرات تستخدم لتعقيم المواد الطبية المعدنية والزجاجية تحت **حرارة ١٢١م^0 وضغط ١٥جو وزمن ٣٠ دقيقة**.

☒ Radiations:

1- Gamma rays: for sterilization of needles, syringes, cannules before used.

تعقم المواد الطبية التي تستخدم لمرة واحدة فقط قبل استخدامه

2- X- rays: تعقم نفس المواد في الطريقة السابقة ولكن عندما تكون طاقة

3- UV light: (germicidal lamp)

تستخدم لتعقيم السطوح والمواد الشفافة وتسبب تحطم بعض أنواع البلاستك مثل البولستيرين.

☒ Filtration sterilization :

Used for sterilized clear liquid like

- Pharmaceuticals المستحضرات الطبية والأدوية
- Protenious solutions السوائل البروتينية

*يكون قطر الفتحات في هذا الفلتر حوالي ٠,٢ µm ليمنع البكتيرية من المرور.

Chemical Sterilization:

- Ethylene oxide:
  - يعقم المواد الحساسة للحرارة التي تتجاوز ٦٠م^0 مثل البلاستك والمواد الكهربائية .
  - يقتل معظم والفايروسات المعروفة ، البكتيرية ، الفطريات ، وكذلك الابواغ البكتيريا.

❖ Glautraldehyde and formaldehyde:

- يستخدم كمثبت ومعقم مقبول
- يعتبر من المواد الطيارة volatile
- يحتاج الى وقت طويل لقتل الابواغ يصل الى ١٢ ساعة.

❖ Hydrogen peroxide agent (H_2O_2):

- مادة خطرة وسامة جدا اذا كان بتركيز عالي ولكنه غير سام عندما يكون مخفف.
- من مساؤه انه يترك مخلفات عند استخدامه كمعقم.

Disinfectants

هي عوامل ضد ميكروبية تستخدم لتحطيم الميكروبات الموجودة على الأشياء الغير الحية مثل سطوح المكاتب وجدران المستشفيات . يجب ان نفرق بين المطهرات والمنظفات وكذلك المضادات الحياتية.

Type of Disinfectant:

Phenolics, Oxidizing agents, Aldehyde, Alcohols.

- Alcohols:

- عادة يتم استخدام الايثانول Ethanol والايزوبروبانول Isopropanol كمطهرات لكنها تستخدم كمنظفات Antiseptics اكثر من Disinfectants .
- غير مخرشة للجلد لكنها قابلة للاشتعال وترك مخلفات بنسب محدودة.
- فعال جدا ضد الابواغ البكتيرية والفطرية.

- Aldehyde:

- عادة يتم استخدام Glautraldehyde وهو فعال جدا ضد الميكروبات ، الفطريات والابواغ .
- مساوئه : ١- يترك مخلفات على المواد
  ٣- يسبب الربو وأضرار صحية.

- Oxidizing agents: (العوامل المؤكسدة)

- هي عوامل تسبب أكسدة الغشاء الخلوي للميكروب مؤدية الى تحلله وبالتالي فقدان التراكيب الخلوية وموت الخلية الميكروبية. ومن هذه العوامل هي:

- Chlorine dioxide: using for drinking water.
- Hydrogen peroxide: يستخدم لتعقيم وتطهير جدران وأرضية وسطوح المستشفيات ويستخدم كمنظف بتركيز ٣%.
- Iodine:

يستخدم ك lugols iodine لتطهير حقول الدواجن.

- Potassium permanganate:

- يستخدم لتعقيم أحواض السباحة وأحواض الاسماك.
- يكون عبارة عن مسحوق يلون أي شيء يلامسها.

- Phenolics:
- Phenol :

- يعتبر من اقدم المطهرات المعروفة استخدمه العالم Lister
- مساوئه ١- مخدش أو مخرش للجلد.

٢- سام بالنسبة للأشخاص الذين لديهم حساسية من هذا المركب.

Antiseptics:

هي مضادات ميكروبية تستخدم لتطهير اجزاء الجسم الحية مثل الجلد والأنسجة لمنع حدوث الإصابة بالامراض أو التعفن.

بعض انواع الantiseptic تكون ذو فعالية قاتلة للميكروبات (Bactericidal) والبعض الاخر تكون ذو فعالية مثبطة لنمو هذه الميكروبات (Bacteristatic).

Some types of Antiseptic بعض انواع المطهرات :

- Alcohol:

الايثانول بتركيز (٦٠-٩٠%) يستخدم لتعقيم الجلد قبل الحقن.

- Boric acid:

استخداماته: ١- تستخدم كتحميله لعلاج الاصابة الفطرية في المهبل .

٢- يستخدم كغسول للعين.

٣- يستخدم مضاد للفيروسات حيث يقلل فترات الاصابة بنزلات البرد.

- Hydrogen peroxide: يوضع على الجرح لتنظيفه وإزالة الرائحة الكريهة

- Iodine: يستخدم بصورة سائلة قبل وبعد العمليات الجراحية.
- Chlorohexidin gluconate:

يستخدم بتركيز(٠،٥- ٤%) بالاشتراك مع الكحول لتعقم الجلد وفي بعض الأحيان علاج التهاب اللثة gingivitis.

- Phenol:

يكون على شكل مسحوق powder ويستخدم بصورة:

-antiseptic body powder.

-mouth washes and throat.

Urine Examination

فحص الادرار

يعد الادرار ومواصفاته ومحتوياته مؤشرات جيدة تعكس الحالة الفسلجية الطبيعية او المرضية للجسم، وهناك نوعان من الفحوصات المختبرية لعينة الادرار هما:

اولا: فحص الادرار العام General Urine Examination

ثانيا: زرع الادرار وفحص الحساسية Culture and sensitivity test

ويقصد به تنمية البكتيريا الموجودة في الادرار على الاوساط الزرعية للتعرف على نوعها وكذلك معرفة أي المضادات الحياتية الحساسة لها ويكتب الطبيب اختصارا Urine for C & S

جمع الادرار:- *Urine collection*

هناك عدة طرق لجمع عينة الادرار حسب نوع الفحص المراد اجراءه وتشمل:

١. جمع عادي: وهو ان يجمع من المريض ٤٠ مل تقريبا من الادرارفي عبوات جافة ونظيفة اذا كان الفحص هو (GUE)

٢. جمع من منتصف المجرى Midstream : وهنا يوضح لمريض بان يترك بداية الادرار وكذلك اخر الادرار ويجمع من منتصف مجرى الادرار في وعاء نظيف وجاف ومعقم وحاوي على غطاء اذا كان المطلوب هو فحص C& S

٣. الجمع التراكمي: وهنا يطلب من المريض ان يجمع إدراره لمدة ٢٤ ساعة في نفس الوعاء كأن يبدأ من الساعة الثامنة صباحا والى الثامنة صباحا من ليوم التالي ولغرض منع حدوث تلوث عينة الادرار بالميكروبات بسبب طول الفترة الزمنية يفضل اضافة مادة حافظة مثل حامض البوريك وحامض الهايدروكلوريك HCl بنسب معينة.

هذا النوع من الجمع مطلوب في حالة التحري عن:

❖ بكتيريا السل Tuberculosis Bacteria والمسبب هو *Mycobacterium tuberculosis* فقد تصيب هذه البكتيريا الكليتين او المجرى البولي وبما ان هذه البكتيريا أعداها قليلة في الادرار ولطول زمن الجيل لهذه البكتيريا (حوالي ١٨ ساعة) يفضل جمع الادرار لمدة ٢٤ ساعة.

١- الفحوصات العيانية: Macroscopic examination

❖ **حجم الادرار: Urine volume**

حجم الادرار المطروح من قبل الشخص الطبيعي هو ١٢٠٠ – ٢٠٠٠ مل في اليوم الواحد واما الحالات التالية التي هي حالات غير طبيعية أسبابها اما فسلجية او مرضية وتشمل:

A – كثرة التبول polyurea : واسباب هذه الحالة اما

مرضية: داء السكري diabetes mellitus

فسلجية: كثرة تناول السوائل.

B – قلة التبول Oligourea : واسباب هذه الحالة اما

مرضية: أمراض القلب والشرايين cardiovascular diseases او الكلية kidney

فسلجية: قلة تناول السوائل.

C – احتباس البول Anurea : توقف الادرار و واسباب هذه الحالة إما:

مرضية: وجود ورم أو حصاة كبيرة في المجاري البولية .

D – عسر التبول Dysurea : في هذه الحالة يحدث تبول ولكن هناك صعوبة والم وادرار متقطع وسببه على الاغلب التهاب المجاري البولية Urinary Tract Infection.

❖ **الوزن النوعي: Specific gravity**

ويقصد به كمية المواد الصلبة الموجودة في الادرار وخاصة الاملاح والبروتين والسكر والقيمة الطبيعية له (١٠٠٨ – ١٠٣٠) وقد تقل قيمته الى حد ١٠٠١ وعندما تفسل الكلية في تركيز الادرار تطرح بول مخفف بينما قد تزداد قيمته لتصل الى ١٠٦٠ اذا كان البول مركز.

❖ **اللون color :**

الادرار الطبيعي يكون لونه اصفر فاتحPale yellow أوقد يكون اصفر غامق Dark yellow نتيجة لوجود صبغة الUrochrom و Urobilin، واللون يعتمد على تركيز الادرار فاذا كان الادرار مركزا (كما في حالة قلة تناول السوائل) فان لونه يكون اصفر غامق، واذا كان مخففا أي ليس مركزا (كما في حالة كثرة تناول السوائل) فان لونه يكون اصفر فاتح. الا ان هناك بعض الحالات المرضية التي تعطي دلالة تشخيصية على نوع الإصابة:

اللون القهوائيBrown color : يشبه لون الشاي وهو دلالة على وجود صبغة Bilirubin في الادرار نتيجة الاصابة بالتهاب الكبد الفيروسي.

اللون الأحمرRed color : نتيجة نزف في المجاري البولية بسبب ورم خبيث او حصاة فتظهر كريات الدم الحمر قي الادرار

اللون البرتقالي Orange color : بسبب تناول الفيتامينات او المضادات الحياتية من قبل المريض.

اللون المائي Watery color : دلالة على الاصابة بمرض السكري.

❖ المظهر Appearance :

يكون الادرار الطبيعي رائق clear وصافي وإذا ظهر بشكل ضبابي cloudy او عكر Turbid دلالة على وجود املاح او ألبومين أو خلايا قيحية.

❖التفاعل (الأس الهيدروجيني (pH Reaction :

الادرار في الحالة الاعتيادية يكون حامضي خفيف الى متعادل وتنحصر قيمته بين (٤ – ٨) ويمكن تقدير ه باستخدام pH meter او بواسطة أوراق Litmus التي يكون لونها في pH المتعادل وردي وفي القاعدي أزرق وفي الحامضي أحمر. (هذا التغيير في اللون يعتمد على نوعية الغذاء أو الادوية المتناولة).

❖ الرائحة Odour :

رائحة الادرار الطبيعية هي اوروماتية مميزة ولكن تركه لفترة يؤدي الى تحول اليوريا الى آمونيا ذات الرائحة النفاذة الكريهة وفي بعض الحالات المرضية كداء السكري يصبح الادرار ذو رائحة تشبه رائحة الفاكهة المتخمرة بسبب احتواءه على الاجسام الكيتونية (Keton bodies)

❖ البروتين أو الزلال Protein or Albumin :

تسمى حالة ظهور البروتين في الادرار proteinurea وهناك ٣ انواع من حالات الادرار البروتيني:

١- الادرار البروتيني العرضي Accidental proteinurea :

يأتي نتيجة تلوث المجرى البولي ببروتينات مصدرها الافرازات المهبلية عند النساء والافرازات المنوية عند الرجال.

٢- الادرار البروتيني الوظيفي Functional proteinurea :

هي حالة ظهور البروتين في الادرار بشكل متقطع دون وجود اعراض مرضية تذكر وسببها اما اجراء تمارين رياضية عنيفة او حمام مائي بارد او المراحل الاخيرة من الحمل عند النساء وكذلك عند الاطفال حديثي الولادة .

٣- الادرار البروتيني العضوي Organic proteinurea :

هذا النوع من البروتينات يأتي عن طريق الدم وخلال عملية تصفية الدم في الكليتين وتصفية وتكون كمية الزلال المطروحة في هذا النوع هي اعلى من تلك المطروحة في النوع الوظيفي. ويلاحظ مثل هذا النوع في حالات التهاب الكلية Nephritis او تلف خلايا الكلية Nephrosis اوبعد تناول مواد سامة معنية او وجود حصى او في بعض حالات الحمل (Toxemia) .

* ان طبيعة البروتين الظاهر في الادرار يمكن حصرها بخمسة أنواع:

١- الالبومين Albumin ٢- المخاطين Mucin ٣- الكلوبين Glubin ٤- الهيموغلوبين Hemoglobin

٥- Bence - Jones protein (في حالة سرطان العظم)

يتم التحري عن وجود الالبومين بطريقتين:

١- **طريقة التسخين** Heating method :

لغرض اجراء الفحص يجب التخلص من جميع المواد المسببة للعكورة في الادرار اما بترشيحه او بواسطة الطرد المركزي Centrifugation ثم ناخذ من الراشح الصافي ويوضع في انبوبة زجاجية وعادة يوضع الى ارتفاع ٣/١ او ٢/١ الانبوبة ويسخن الجزء العلوي من الادرار على اللهب لمدة (٢) ثانية فاذا بقي رائقا هذا يدل على عدم وجود الالبومين ويكتب Nil اما اذا ما خدث تضبب فهذا يدل اما وجود املاح salt او Albumin ولمعرفة ايهما المسبب في تكوين التضبب او العكورة يضاف ٣% من حامض ألخليك Acetic acid بشكل قطرات بالتدريج فاذا اختفى التضبب واصبح الادرار رائق معناه الموجود هو الاملاح وليس الالبومين. اما عند اضافة الحامض وبقاء التضبب هذا يعني ان التضبب سببه الالبومين الذي يكون بدرجات وكالاتي:

Trace	تضبب خفيف
+	تضبب واضح
++	تضبب أكثر وضوحا
+++	حبيبات متكتلة صغيرة
++++	حبيبات متكتلة كبيرة

٢- طريقة استخدام Sulfa salicylic acid :

تتم باستخدام تركيز ٣% من هذا الحامض وفي هذه الطريقة لايحتاج الى تسخين الادرار، يؤخذ (٢) مل من الادرار ويضاف له كمية مساوية من ٣% من الحامض ويترك لمدة (١٠) دقائق وتقرأ النتيجة كما في الطريقة السابقة.

<u>٣- فحص السكر:</u>

ان مستوى السكر الطبيعي في الدم هو ٨٠ – ١٢٠ ملغم/ ١٠٠مل وطبيعيا ايضا لا يظهر السكر في الادرار لان عتبة الكلية kidney threshold تستطيع ان تعيد امتصاصه الى الدم لحد تركيز ١٨٠ ملغم بعدها يبدأ الظهور في الادرار وتسمى هذه الحالة Melliturea (أي نوع من السكر ما عدا الكلوكوز) بينما تسمىglucoseurea وفي حالة ظهور سكر كلوكوز في الادرار خاصة في حالة عند المصابين بداء السكري Diabetes Mellitus ويمكن التحري عنه بنوعين من الكواشف:

١- كاشف بندك Benedict reagent

٢- كاشف فهلنك Fehling reagent

ويعتبر كاشف بندكت الاكثر شيوعا في المختبرات حيث تؤخذ ١مل من كاشف بندكت الازرق في انبوبة اختبار ويضاف له قطرتين من الادرار ويسخن على اللهب لمدة(٢) ثانيه او يوضع في حمام مائي مغلي لمدة(٥) دقائق فاذا بقي اللون الازرق دلاله على عدم وجود السكر ويكتب (Nil) اما اذا اصبح اللون اخضر مزرق يعني وجود سكر قليل(+) واذا كان اللون اخضر غامق(++) واذا اصفر(+++) واذا تحول الى الاصفر النحاسي (++++) علما ان كل + =٦٠ ملغم من سكر كلوكوز في الادرار

٤- **الصفراء** Bile

مادة الصفراء ناتجة عن الايض في الكبد وتطلق الى مجرى الدم بعدة اشكال هي صبغة الصفراء Bilirubin ومادة Urobilinogenوأملاح الصفراءBile salt وعندما يزداد تركيزها في الدم تطرح في الادرار وظهورها في الادرار دلاله على مرض ابو صفار (اليرقان Jaundice) الذي اما سببه فايروسات التهاب الكبد الفيروسيViral hepatitis اوسموم اخرى ادت الى تلف خلايا الكبد .

❖ الكشف عن صبغة الصفراء Bilirubin

١-فحص الرغوة Foam test

يوضع الادرار الى ثلث الأنبوبة ويسخن الجزء العلوي منه لدرجه الغليان حتى ظهور رغوه على سطحه فاذا كانت غير ملونة دلالة على ان الفحص سالب اما اذا كانت الرغوة صفراء فالفحص موجب .

٢- فحص سميث Smith test:

يوضع ١مل من كاشف سميث (١ جزء من اليود +٩ جزء من الكحول) في أنبوبة اختبار ويضاف له الادرار بشكل تدريجي على الجدران فإذا ظهرت حلقة خضراء عند نقطة التقائه بالكاشف فالفحص موجب فاذا لنم تظهر فالفحص سالب .

❖ الكشف عن Urobilinogen

ويسمى بفحص Ehrlich Aldehyde test وفيه يخلط ١٠ مل من الادرار مع ٢،٥ مل من كلوريد الباريوم $BaCl_2$ بتركيز ١٠% ويرشح من خلال ورقة ترشيح ثم يؤخذ من الراشح ٢- ٣ مل ويضاف له ٠،٥ مل من كاشف Aldehyde ويترك لمدة (٣) دقائق فإذا أصبح لونه وردي فان الفحص موجب .

ملاحظة: قد يعطي هذا الفحص نتيجة سالبة على الرغم من احتواء الادرار على مادة Urobilinogen خاصة اذا كان الادرار قديم لان هذه الصبغة تتأكسد بالهواء متحولة الى مادة Urobilin .

❖ الكشف عن املاح الصفراء Bile salts

❖ ويتم بواسطة فحص Hays test حيث تضاف كمية قليلة من مسحوق زهرة الكبريت sulfur flower على سطح عينة الادرار فإذا ترسبت في القعر فيدل ذلك على وجود Bile salts اما إذا بقي الكبريت طافيا على السطح دلالة على عدم وجود أملاح الصفراء لان هذه الأملاح تقلل من الشد السطحي للإدرار .

ب- الفحص ألمجهري Microscopic Examination of Urine

نضع عينة الادرار في أنبوبة اختبار ونضعه في جهاز الطرد المركزي لحد ٤/٣ الأنبوبة ثم تطرد مركزيا بسرعة (٣٠٠٠ – ٥٠٠٠) دورة بالدقيقة RPM لمدة ١٥ دقيقه ثم يهمل الراشح supernatant ونأخذ الراسب precipitate يرج shacking الراسب بجهاز الهزاز vortex او باليد تؤخذ قطره من الراسب وتوضع على سلايد نظيف وجاف ثم يوضع عليه cover slip ونفحص تحت المجهر بالقوه4X ثم 10X ثم 40X لمشاهدة:

❖الخلايا القيحيه : Pus cells

وهي عباره عن خلايا دم بيضاء من نوع متعددة النواة(Polymorphonucclear cells (PMN على الاغلب Neutrophils تظهر متوسطة الحجم أميبية الشكل ذات لون اخضر فاتح براق كثيرة الحبيبات وانويه كثيرة الفصوص يعطي ظهورها دلاله على -

- التهاب المجاري البوليةUTI والتهاب الكلية Nephritis

- في حالة التدرن tuberculosis الناشئ عن بكتيريا*Mycobacterium tuberculosis* التي تصيب المجرى البولي والكليتين ونستدل عليه من وجود Pus cells .

- السيلان الناشئ عن بكتيريا *Neisseria gonorrhea*

يتم حساب عدد خلايا ال Pus cells على أساس حقل مجهري عالي القوه High power field(hpf) وتحسب كما يلي:

Trace 2 – 3/ hpf

(+) 8 – 10/ hpf

(++) 10 – 20/hpf

(+++) 20 – 30/hpf

(++++) more than 30/hpf

-في بعض الحالات قد يعطي الفحص للخلايا القيحيه نتيجه موجبه ولكن عند زرع الادرار تكون نتيجة الزرع سالبه وذلك للاسباب التاليه:

١- اذا كان الشخص تناول مضادات حيوية Antibiotics لانها تقتل البكتريا ولا يظهر نمو زرعي لذلك يجب اخذ عينة الادرار بعد(٣) ايام من قطع تناول المضادات

٢- ان يكون سبب الالتهاب بكتيريا *Neisseria gonorrhea* التي تموت بالادرار فتعطي نتيجة زرع سالبه لذلل يجب اخذ عينة من إفرازات الاحليل urethral discharge للرجل او مسحة عنق الرحم cervical swab للمرأة.

٣- اذا كان سبب الالتهاب بكتيريا التدرن الكلوي Renal tuberculosis او بكتيريا Leptospira التي لا تنمو على الاوساط الزرعية الاعتيادية وانما اوساط خاصة

٤- اذاكان سبب الالتهاب فيروسات وليس بكتيريا مثل فيروس (CMV) *Cytomegalovirus* الذي لا ينمو على الاوساط الزرعيه البكتيرية.

❖كريات الدم الحمر : Red blood cells

ظهور الدم في الادرار يكون بنوعين اما بشكل كريات دم حمراء واضحة وتسمى هذه الحاله الادرار الدموي Hematurea ويكون لونه احمر ولو ان الكريات تكسرت وأطلقت ما تحويه من هيموغلوبين تسمى الحاله الادرار الهيموغلوبيني haemoglubinurea ويكون لونه بني.

والسبب هنا اما ان يكون طبيعي خاصة عند النساء في بداية او نهاية الدورة الشهرية او مرضي بسبب التهاب الكلية او وجود حصوة متحركة او ورم خبيث Malignant tumor .

تظهر كريات الدم الحمر (RBC) بشكل اقراص دائرية اصغر من الخلايا القيحية ، عديمة النواة وشاحبة وتحسب اعدادها بنفس طريقة حساب الخلايا القيحية.

❖الخلايا الطلائية: Epithelial cells

وهي خلايا كبيرة الحجم تكاد تكون مغزلية الشكل احادية النواة تنسلخ من بطانة المجاري البولية ويكون ظهورها طبيعي في الادرار خاصة عند النساء ولكن زيادة عددها يعطي مؤشرا بوجود التهاب وقد يستفاد منها لتحديد وجود ورم أو لا.

البلورات Crystals :

وهي بلورات الاملاح المطروحة في الادرار والتي تختلف باختلاف الpH للادرار واهمية تشخيصها لغرض معرفة احتمالية ان تكون حصاة وذلك لكي يتمكن الطبيب من اعطاء نوع المدرر الملائم للمريض فاذا كانت البلورات الملحية عنده من نوع حامضي يعطيه مدرر قاعدي والعكس صحيح.

- في حالة الإدرار الحامضي البلورات المهمة التي تظهر فيه هي :

1- Calcium oxalate :

تكون صغيرة او كبيرة واحيانا متجمعة في حالة بداية تكوّن الحصاة وهذا النوع من الأملاح هو الذي يكون الحصاة في المجرى البولي وتظهر هذه البلورات باشكال مختلفة

2- Amorphous urate :

تظهر بشكل حبيبات رملية ناعمة وتكون بشكل تجمعات.

3- Uric acid :

تكون بلورات حامض اليوريك بشكل صفائح رقيقة وتكون صفراء اللون وتظهر عند الاشخاص المصابين بالحصاة او ب Uric acid في الدم. وتكون بشكل قطع الزجاج المتكسر.

- في حالة الادرار القاعدي البلورات التي تظهر هي :

1- Calicium carbonate:

نفس النوع الاول (Ca oxalate) في الادرار الحامضي مع تغيير الاسم اما الشكل فهو نفسه ويعرف بهذا الاسم عند عمل فحص الReaction أو pH لمعرفة هل ان الادرار حامضي او قاعدي وعلى ضوءه يكتب النوع.

2- Amorphous phosphate:

تجمعات رملية ناعمة تشبه Amorphous urate الموجود في الادرار الحامضي ولكن عندما يكون الادرار قاعدي تعرف بهذا الاسم.

3- Triple phosphate:

تظهر بشكل حزم بلورية احيانا وهذه تظهر بأشكال مختلفة .

❖البروتينات Cast

وهي عبارة عن بروتينات غير طبيعية Abnormal protein تتكون داخل النبيبات الكلوية

نتيجة الاصابة بأمراض معينة وتظهر بشكل قضبان اسطوانية اما مفتوحة النهايتين او مدورة النهاية وتكون مختلفة الأطوال والأعداد. وتقسم استنادا الى نوع المكونات الموجودة داخلها الى:

1- Hyaline cast:

عبارة عن قضبان فارغة وهي اخطر الانواع لان ظهورها دليل على حدوث تلف شديد في نسيج الكلية او فشل كلوي.

2- Granular cast:

عبارة عن قضبان مملوءة بحبيبات البلورات الملحية

3- RBCs cast:

عندما يكون الجسم الاسطواني فيه خلايا RBCs .

4- Pus cast:

عندما يكون الجسم الاسطواني فيه خلايا قيحية Pus cells

ملاحظة: اذا ظهر بالفحص العياني للادرار Albumin يجب ان يكرر الفحص على Cast في الفحص المجهري لأنه يجب ان يظهر Cast واذا لم يظهر فهذا يدل على ان الألبومين الذي ظهر في الفحص هو من نوع Accidental albumin .

الطفيليات : Parasites

الطفليات التي تظهر في الادرار هي :

١- طفيلي *Trichomonas vaginalis* وهو من الطفيليات السوطية Flagellate التي تسبب التهاب المجاري التناسلية والبولية عند النساء والرجال وهو ينتقل عن طريق الاتصال الجنسي، تكون حركة المسبب سريعة تحت المجهر وذو شكل مغزلي.

٢- بيوض البلهارزيا Belharizian ova خاصة اذا كان الادرار دموي Hematurea ، هذه البيوض تكون ذات شوكة مميزة في نهايتها والطفيلي المسبب Schistosoma hematobium

اخرى : Others

١- بكتيريا : *Enterobacter, Proteus, Klebsella, E. coli*

٢- فطريات : *Monilia, Candida albicans*

٣- المخاط Muciod وهي من افرازات الغدد المخاطية الموجودة في القنوات البولية وتظهر بشكل خيوط وجودها طبيعي لا يعطي دلالة بوجود حالة مرضية .

- خلاصة فحص الادرار مجهريا:

Pus cells: Trace, +,++,+++,++++

RBCs : Trace, +,++,+++,++++

Epithelial cells: Trace, +,++,+++,++++

Crystals : Ca oxalate , Amorphous, …….

Cast : Hyaline cast, RBCs cast,……..

Parasites : Trichomonas vaginalis, ……

Others : Bacteria, or Monilia, or Muciod.

<u>زرع الادرار</u> : Urine culture

عينة الادرار الخاصة بالزرع تمتاز بما يلي :

١- ان يجمع في قناني معقمة في الفرن بدرجة ١٨٠ م^{o} لمدة ساعتين

٢- ان يجمع الادرار من منتصف المجرى Midstream .

٣- ان يجمع قبل الزرع بربع ساعة لكي لا نسمح بنمو البكتيريا وازدياد عددها

٤- ان يكون المريض قد انقطع عن تناول المضادات الحياتية قبل ثلاثة أيام قبل الزرع

- **الاوساط الزرعية المستخدمة: Culture media**

يؤخذ من عينة الادرار قطرة واحدة بواسطة Loop حلقته قطرها ٠،٣ سم ويزرع بطريقة التخطيط على نوعين من الاوساط الزرعية وتوضع في الحاضنة بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة وهذه الاوساط هي :

١- وسط أكار الدم Blood agar

وهو وسط أغنائي enrichment media يشجع نمو البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ويستفاد منه لمشاهدة ظاهرة تحلل الدم Hemolysis ولون المستعمرات .

٢- وسط اكار المكونكي MacConkey agar :

وهو وسط تفريقي وانتقائي في ان واحد ويستخدم لتثبيط نمو البكتيريا الموجبة لصبغة كرام ويشجع نمو السالبة لصبغة كرام اضافة الى انه يفرق بين البكتيريا المخمرة لسكر اللاكتوز وغير المخمرة وهذا يظهر من خلال لون المستعمرات البكتيريا على هذا الوسط.

فحوصات التشخيص: Identification tests

١- فحوصات عيانية: Macroscopic examination

من خلال التعرف على شكل ولون ولزوجة المستعمرات والصبغات المتحررة منها وقابليتها لتحلل الدم.

٢- فحوصات مجهرية: Microscopic test

وتتم بواسطة صبغة كرام لتحديد نوع البكتيريا

٣- التشخيص: Identification من خلال الفحوصات الكيموحياتية Biochemical tests والمصليةserological tests واحيانا باشتخدام العاثيات الفيروسية phage typing والتي منها يتم تحديد نوع البكتيريا المعزولة من الادرار والتي على الاغلب تشمل Enterobacter, Pseudomonas, Proteus, Klebsella, E. coli والتي تكون مسؤولة عن إصابات القناة البولية .

٤- فحص الحساسية: Sensitivity tests

ويسمى احيانا Antibiogram والذي فيه يتم تنمية البكتيريا المعزولة من الادرار على وسط Muller- Hinton agar لتحديد نوع المضاد الحيوي الحساسة له لكي يعتمده الطبيب في العلاج والطريقة المتبعة لاجراء فحص الحساسية Kirby – Bauer method ومن المضادات الشائعة هي :

- Gentamycin or Gentamicin
- Tetracycline
- Methoprim
- Chloramphenicol
- Streptomycin
- Penicillin

نتيجة الفحص تقرأ وتكتبR= Resistance عندما لاتظهر منطقة زوال نمو حول قرص ال Antibiotic فدلالة على ان البكتيريا مقاومة لهذا المضاد، وقد تقرأ وتكتب S = Sensitive عندما تظهر منطقة زوال نمو حول المضاد دلالة على ان البكتيريا حساسة لهذا المضاد وتعتمد درجة الحساسية على اكبر حجم ال Zone حول المضاد حيث انه كلما كان حجم Zone كلما كان المضاد أكثر فعالية على البكتيريا.

Stool Examination

فحص الخروج العام يسمى General Stool Examination ويكتب اختصارا (GSE) ويشمل:

اولا: الفحص الفيزياوية Physical examination

ثانيا: : الفحص المجهري Microscopic examination

ثالثا: الفحص الكيمياوي Chemical examination

اولا الفحص الفيزياوية : Physical examination

وهو الفحص العياني للخروج لمشاهدة ما يلي :

١- الكمية Quantity :

يطرح الشخص البالغ ما مقداره ١٥٠ – ٢٥٠ غم من الخروج يوميا وتشكل البكتيريا حوالي ٣/١ – ٢/١ من الوزن الجاف للخروج.

٢- القوام او الهيئةConsistency & Form :

الخروج قد يكون صلب Solid وهذا يدل على وجود حالة إمساك Constipation وقد يكون الخروج نصف صلب Semisolid وهذا يكون بسبب حالة إسهال او بسبب تناول مواد ملينة Laxative تسهل التبرز.

احيانا عندما يكون البراز solid يكتب في التقرير Formed أي ذو هيئة ، وعندما يكون نصف صلب Semisolid يسمى semi formed وقد يكون الخروج سائل Liquid او مائي Watery في حالات الاسهال Diarrhea واحيانا يكون ابيض مثل فوح ألتمن Rice water في حالات الاصابة بالكوليرا التي تسببه بكتيريا Vibrio cholera وقد يكون الخروج بشكل شريطي Flattened هذا يدل على وجود انغلاقات قد يكون سببها اورام موجودة في الامعاء.

٣- اللون Color:

- اللون الطبيعي للخروج هو اللون البني او القهوائيBrown بسبب احتوائه صبغات الصفراء Bile pigments .
- اللون الاسود Black color وسببه وجود نزف في الامعاء او نتيجة لوجود كميات كبيرة من الحديد في الخروج وهذه تشاهد عند الاشخاص المصابين بفقر الدم والمتعاطين لعلاجات تحتوي على الحديد.

٤- الرائحة Odour :

الرائحة الاعتيادية للخروج سببها مادة الاندول Indol والسيكاتول skatolالناتجة بسبب العمليات الايضية وتزداد بشكل ملحوظ بعد تناول وجبة غنية باللحوم .

٥-الدم والمخاط Blood & Mucus :

- اما ان يكون الدم موجود على السطح الخارجي الغائط وهذا سببه اما تلوث بدم الدورة الطمثية عند النساء او بدم البواسير او بسبب فطر في المقعد
- قد يكون الغائط Feces ممزوجا بالدم والمواد المخاطية وسببه اما دزنتري أميبي Amoebic dysentery او دزنتري عصوي Bacillary dysentery .

٦- الديدان Worm:

هنا قد يشاهد بالعين المجردة اما ديدان كاملة او قطع منها.

ثانيا: الفحص المجهري Microscopic examination

١ – المسحات المباشرة Direct smear او التحصيرات المؤقتة temporary preparations :

❖ Saline preparation : يؤخذ سلايد Slide نظيف وتوضع قطرة من Normal saline ويؤخذ جزء قليل من Stool ويفضل ان يكون من الطبقة السطحية لان سطح الخروج يمثل سطح الامعاء وعادة الطفيليات تكون على سطح الامعاء لذلك يؤخذ النموذج بواسطة عود ثقاب Wood stick من السطح ويمزج مع قطرة من Normal saline ويفحص بعد وضع cover slipe بالعدسة الصغرى والكبرى

❖ Iodine preparation : تستعمل هذه الطريقة بصورة اساسية لمعرفة المميزات التشخيصية للادوار المتكيسة Cysts للابتدائيات Protozoa اذ لا يمكن تمييزها في تحضيرات normal saline تتم هذه الطريقة بوضع قطرة من محلول اليود في وسط slide نظيف وتمزج فيها كمية قليلة من stool ويوضع cover slip ويفحص بقوة التكبير الصغرى ثم الكبرى بالمجهر.

٢- طرق التركيز Concentration method :

قد لايمكن الكشف عن وجود الادوار المتكيسة cysts الابتدائيات او بيوض Eggs الديدان في المسحات المباشرة direct smear عندما تكون موجودة باعداد قليلة كذلك عندما يظهر طفيلي واحد او أكثر في المسحات المباشرة فان انواع اخرى يمكن الكشف عنها عند تركيز عينة الغائط او الخروج لذلك ان اتباع احدى طرق التركيز التالية يجب ان تستعمل في كل عينات stool المعد للفحص بغض النظر عما اذا كانت المسحة المباشرة ايجابية Positive او سلبية Negative .

ان جميع طرق التركيز تستخدم طريقتين:

أ- طريقة التعويم :Floatation method

تعتمد هذه الطريقة على ان الCyst، eggs تطفو في بعض المحاليل ذات الكثافة النوعية العالية وتتجمع في الطبقة العليا بينما لا تطفو بعض مكونات الstool وتبقى في الاسفل ويعد محلول كبريتات الزنك($ZnSO_4$) من المحاليل المفضل استخدامها في هذه الطريقة وتتلخص هذه الطريقة في النقاط الاتية :

١. تذاب كمية من stool في الماء ثم يرشح المحلول العالق ويجمع الراشح في انابيب خاصة وتطرد مركزيا بجهاز الطرد المركزي centrifuge لمدة دقيقة واحدة ويتم التخلص من العائم supernatant .

٢. يضاف قليلا من الماء الى الانبوبة لاذابة الجزء المترسب ثم تملا الانبوبة بالماء وتعادل الى جهاز الطرد المركزي، وتعاد عملية الغسيل والترسيب حتى يصبح العائم رائقا.

٣. يضاف الى الراسب قليلا من محلول ($ZnSO_4$) لمزج الراسب ثم نملا الانبوبة بالمحلول نفسه ثم تطرد مركزيا، نرفع الانبوبة بعناية تامة من الجهاز ويتم تحضير مسحات smear مصبوغة باليود وغير مصبوغة من سطح المحلول في الانبوبة وتفحص تحت المجهر.

ب- طريقة الترسيب :Sedimentation method

ان الترسيب الطبيعي لمزيج stool او استعمال جهاز الطرد المركزي لتعجيل الترسيب الغرض منها تخليص ال Stool من معظم الصبغات والفضلات الخفيفة وتستعمل غالبا في حالة الديدان لان بيوضها لا تطفو جيدا في المحاليل المتوفرة. هناك كثير من طرق الترسيب يستعمل بعضها الماء او normal saline وغيرها.

وتعد طريقة الترسيب باستخدام محلول الفورمالين formalin مع الايثرEther والذي يسمى Formalin – Ether sedimentation technique وهي الشائعة وتتلخص بإتباع الخطوات الاتية:

١. تذاب كمية من stool في الماء ثم يرشح المحلول العالق ويجمع الراشح في أنابيب خاصة وتطرد مركزيا بجهاز الطرد المركزي centrifuge لمدة دقيقتين ويتم التخلص من العائم supernatant .

٢. يضاف قليلا من الماء الى الانبوبة لاذابة الجزء المترسب ثم تملا الانبوبة بالماء وتعاد الى جهاز الطرد المركزي، وتعاد عملية الغسيل والترسيب حتى يصبح العائم رائقا .

٣. يضاف قليلا من ٥% فورمالين لمزج الراسب فيه ثم تضاف كمية اخرى من الفورمالين لتملا الانبوبة ثم تترك لمدة ٥ دقائق لقتل الطفيليات وتثبيتها (ويمكن حفظ العينة في هذه الخطوة لمدة غير محدودة).

٤. يرج shacking المحلول وتضاف اليه كمية من الايثر وتغلق الانبوبة وترج بقوة ثم توضع في جهاز الطرد المركزي وتدور بسرعة ٢٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة دقيقتين.

٥. يتم التخلص من العائم ويؤخذ الراسب ويتم تحضير مسحات smear مصبوغة باليود وغير مصبوغة من سطح المحلول في الانبوبة وتفحص تحت المجهر.

وفي الفحص المجهري للخروج يتم ملاحظة ما يلي :

- خلايا قيحية Pus cells
- خلايا دم حمراء Red blood cells
- فطريات Fungi
- **الطفيليات الابتدائية Protozoa**

أ- Entamoeba histolytica يتم التحري عن الطور الخضري Trophozoite والمتكيس Cyst وهي المسببة لمرض الدزنتري الاميبي Amoebic dysentery

ب- Entamoeba coli يكون تواجدها طبيعي يتم التحري عن الطور الخضري Trophozoite والمتكيس Cyst.

ج- Giardia lamblia يتم التحري عن الطور الخضري Trophozoite والمتكيس Cyst وهي مرضية تسبب الاسهال المائي عند الاطفال خاصة.

د- Balantidium coli يتم التحري عن الطور الخضري Trophozoite والمتكيس Cyst وهي مرضية تسبب Balantidiasis في القولون.

- **الديدان الطفيلية Worms :**

أ- الدودة الدبوسية: Enterobious vermicularis ويتم التحري عن بيوض الدودة وتكون ذات سطح محدب واخر مسطح ونهاية مدببة.

ب- دودة الإسكارس Ascaris lambricoides ويتم التحري عن بيوض الدودة التي تمتاز بمحتوى حبيبي اصفر الى قهوائي محاطة بغشاء البوميني Albuminic membrane غير منتظم.

ج- دودة الانكلستوما : Ancylostoma

د- الدودة الشريطية: Taenia يتم التحري عن قطع الدودة التي تخرج مع الخروج

هـ -دودة البلهارزيا في القناة الهضمية Schistosoma mansoni ويتم التحري عن بيوض الدودة المميزة بشوكتها.

ثالثا: الفحص الكيمياوي Chemical Examination

يجرى هذا الفحص عندما يكون كمية الدم في الخروج ضئيلة جدا او ما يسمى بالدم الخفي Occult blood والذي لايمكن الكشف عنه بالطرق الفيزياوية ولذلك صمم له فحص Occult blood test الذي يعتمد على مبدأ وجود مادة ال Hem وهي

الجزء الأساسي في كريات الدم الحمر من خلال كشف لوني يتم تحديده باستخدام الكواشف. والطريقة المستخدمة هي Benzidin method يتم بأخذ جزء من الخروج ويضاف (٥) مل من الماء في انبوبة اختبار ويمزج بشكل جيد ويؤخذ من هذا المزيج (١) مل ويضاف اليه كاشف Benzidin بمقدار (١) مل ويضاف اليها بيرو كسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز ٣% حيث يضاف عدة قطرات ويكون قراءة النتائج بظهور اللون الازرق بشدة مختلفة ++++،+++،++،+،Trace وكلما كان اللون غامق بشدة يدل على ان كمية الدم الموجودة كبيرة.

ملاحظة: عند إجراء هذا الاختبار يجب الانتباه الى ان هناك عوامل اخرى قد تعطي نتائج موجبة للفحص وتشمل:

١. اذا كان الشخص تناول كميات كبيرة من اللحم الأحمر لانه يحتوي على أنزيمات هاضمة الهيموغلوبين.

٢. اذا كان الشخص تناول كميات مفرطة من فيتأمين C .

٣. اذا كان الشخص تناول مشتقات الحديد.

زرع الخروج Stool culture

اهم النقاط التي يجب اخذها بنظر الاعتبار عند جمع عينة الخروج هي:

١. ان تجمع العينة قبل ساعة من الزرع.

٢. ان لا تختلط العينة بالادرار خاصة عند الاطفال وكبار السن.

٣. ان لا تترك العينة بدرجة حرارة الغرفة وانما بدرجة (٤ – ٨م°) في الثلاجة لحين زرعها.

يتم اخذ عينة من الخروج بواسطة loop وتزرع على الاوساط الزرعية المعدة وحسب الحالة المشكوك بها.

- تزرع العينة على وسطي Blood، MacConkey وبعد فترة حضانة (١٨ – ٢٤ساعة) بدرجة حرارة ٣٧م° نلاحظ أشكال المستعمرات على وسط Blood وقابليتها على تحلل الدم. أما على وسط المكونكي فنلاحظ المستمرات ; هل هي مخمرة لسكر اللاكتوز Lactose fermenter أو غير مخمرة Lactose non fermenter . فاذا كانت البكتيريا Lactose fermenter تكون المستعمرات الظاهرة وردية اللون ومثالها بكتيريا: E. coli ، Enterobacter، Klebsella ، أما اذا كانت البكتيريا lactose non fermenter تكون المستعمرات الظاهرة صفراء اللون شاحبة Pale yellow colonies ومثالها بكتيريا: Salmonella، Shigella، Pseudomonas، Proteus .

ويمكن التفريق بين بكتيريا Salmonella و Shigella باجراء الفحوصات السيرولوجية و الكيموحياتية .

بالنسبة لبكتيريا Proteus يمكن تشخيصها عن طريق ظاهرة التموج Swarming phenomena اما بكتيريا Pseudomonas فانها تفرز صبغة Pyocyanin الزرقاء المخضرة ورائحة الوسط تكون شبيهة برائحة الفاكهة المتعفنة.

اغلب حالات الاسهال عند الأطفال الذين هم دون (٢) التي تكون سببها Enteropathogenic E. coli .

ملاحظة: عملية الزرع تتم بعد الفحص المجهري للخروج، عادة يكون الزرع في حالات الإسهال واذا لم يظهر بالفحص المجهري طفيليات وظهر فقط Pus cells ،هنا يجب الزرع.

وبعد عملية الزرع يتم إجراء فحص الحساسية للمضادات الحياتية Antibiogram test ومن المضادات المستخدمة على بكتيريا الخروج هي:

Gentamycin, Chloramphenicol, Methoprim, Ampicillin, Cefotaxime, Tetracycline.

فحص السائل المنوي SEMINAL FLUID EXAMINATION

ويشمل نوعين من الفحوصات:

١- الفحوصات العيانية MACROSCOPIC EXAMINATION

٢- الفحوصات المجهرية MICROSCOPIC EXAMINATION

الفحوصات العيانية : وتشمل هذه الفحوصات

- **الحجم Volume**

كمية السائل المنوي الي تخرج في دفعة واحدة one eject عند الشخص السليم يكون حجمها ٤-٥ مل وقد تصل الى حد ١٠ مل. اما في الحالات الغير طبيعية (abnormal cases) فقد تكون بضع قطرات. ويتم قياس حجمها بواسطة small cylinder.

- **اللون Color**

يلاحظ ان لون السائل المنوي الطبيعي هو اللون الحليبي milky او الرمادي الفاتح pale gray . اما في الحالات المرضية فاما ان يكون اصفر yellow في حالة وجود التهابات قيحية pyogenic infection ، او قد يكون لونه بني في حالة وجود نزف من احد الشعيرات الدموية blood capillaries.

- **اللزوجة Viscosity**

السائل المنوي في الحالات الطبيعية يكون لزجا viscous ويتحول الى سائل عديم اللزوجة خارج الجسم وخلال مدة زمنية لا تتجاوز ٣٠ دقيقة. والمدة الطبيعية هي من ١٥-٣٠ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧م^{o} (في الحاضنة) . واذا بقي السائل المنوي لزجا بعد انتهاء النصف ساعة نستمر بوضعه في الحاضنة وملاحظته الى ان يصبح الوقت ساعة، اذا بقي لزجا يكتب عندئذ في التقرير (reportage) :

Viscous after 1 hr incubation at 37^{o}C

اما اذا اصبح سائلا بعد نصف ساعة فيكتب في التقرير: liquefaction within 30 minute at 37 ^{o}C .

لزوجة السائل المنوي تعتبر من العوامل التي تسبب العقم وذلك لان لزوجة السائل تعيق حركة الحيامن فتبقى محصورة ضمن المادة المخاطية وبذلك لا تستطيع تلقيح البيضة.

- **التفاعل Reaction**

pH السائل المنوي يكون متعادل الى قاعدي ٧،٥- ٨ ويمكن الكشف عنه باستخدام الـ pH paper.

الفحوصات المجهرية: وتشمل هذه الفحوصات

- طريقة العدّ Counting method في هذه الطريقة تم قياس اعداد sperms الحيامن الموجودة في السائل المنوي بعد ان يتم اسالته او تميعه liquefaction اما اذا كان لزجا فلا يجوز حسابها لانه لايعطي فكرة عن الاعداد. ويستخدم في حساب الحيامن:

١- الطريقة المباشرة direct method

تتم هذه الطريقة بأخذ قطرة من السائل المنوي ووضعها على سلايد نظيف ثم تغطى بغطاء الشريحة cover slip ويفحص مباشرة باستخدام القوى الكبرى high power وكلاتي : كل (٥) حيامن sperms في حقل مجهري واحد one microscopic field تمثل ١٠٠٠٠٠٠ حيمن في مل او سم^{٣} .

٢- طريقة العدّ المجهري heamocytometer method

تتم هذه الطريقة باستخدام نفس السلايد heamocytometer slide الذي يستخدم في حساب WBCs الذي يحتوي على اربع مربعات كبيرة طرفية لحساب (لحساب WBCs و الحيامن) ومربع وسطي يستخدم لحساب RBCs ، المربعات الاربعة الطرفية تحتوي كل منها على ١٦ مربع صغير.

طريقة العمل هي نفسها لحساب ال WBCs :

١- نحضر الشريحة الخاصة بالعد.

٢- يسحب السائل المنوي بعد ذوبانها بنفس الماصة الخاصة بسحب الـWBCs| لحد العلامة ٠،٥ ثم يكمل الحجم الى حد العلامة ١١ بواسطة المحلول المخفف diluents solution of seminal fluid .

* المحلول المخفف يتكون من٥غم بيكاربونات الصوديوم+ ١مل من الفورمالين ثم يكمل الحجم بالماء المقطر الى ١٠٠ مل.

٣- بعد سحب السائل المنوي وتخفيفه يمزج بمسك الماصة pipette بين السبابة والابهام وقلبها عدة مرات ثم التخلص من بضع قطرات.

٤- نملا غرفة العدّ (في counting champer) ثم تحسب اعداد السائل المنوي تحت المجهر في الاربعة حقول ونطبق المعادلة:

$$Count/ml = N/4 \times 10 \times 1000 \times 20$$

N= مجموع العدد في الربعة مربعات

١٠= معامل الحجم : (حيث ان مساحة كل مربع طرفي هو ١ملم^{٢} العمق هو ٠،١ ملم لذلك فان حجم السائل المنوي الذي يوضع في كل مربع يكون:

١ملم^{٢} ×٠،١ ملم= ٠،١ ملم^{٣} ولتحويل هذا الحجم الى ١ ملم^{٣} نضرب × ١٠

١٠٠٠= عالميا الأعداد تحسب بالـ مل او سم^{٣} لذلك لتحويل ١ملم^{٣} إلى مل او سم^{٣} نضرب × ١٠٠٠

٢٠= معامل التخفيف

لذلك فان المعادلة النهائية هي $count/ml = N \times 50000$

- ✓ عدد الحيامن بالنسبة للاشخاص الطبيعيين من ٥٠-٨٠ مليون في الـ مل اما بالنسبة لفرصة الحمل فان عدد الحيامن يجب ان يكون من ٣٠-٣٥ مليون في الـ مل وخصوصا اذا كانت ذا نشاط عالي highly active .
- ✓ في حالة ظهور حيمن واحد او اثنين او اعداد قليلة فيكتب في التقرير حيامن قليلة Oligospermia
- ✓ في حالة عدم ظهور حيامن فيكتب في التقرير Azospermia حيث يكون الشخص عقيم sterile .

- **الحركة Motility**

تؤخذ شريحة زجاجية نظيفة ويوضع عليه قطرة من السائل المنوي ثم تفحص لملاحظة حركة الحيامن حيث تقسم حركة الحيامن الى :

- الحركة النشطة active motile
- الحركة البطيئة sluggish motle

- عديمة الحركة non motile

عند الفحص بالقوى الكبرى يحسب اعداد الحيامن النشطة والبطيئة الحركة اضافة الى العديمة الحركة. في عدة حقول مجهرية microscopic fields ثم يؤخذ المعدل وتحسب اعدادها على اساس النسبة المئوية % . حركة الحيامن للشخص الطبيعي من٥٠-٧٠% وكلما زادت الحركة كان نسبة التلقيح اعلى Best fertility.

- **الشكل shapr**

تؤخذ شريحة زجاجية نظيفة ويوضع عليه قطرة من السائل المنوي ثم تفحص لملاحظة شكل الحيامن. شكل الحيامن اما ان يكون طبيعي normal shape او غير طبيعي abnormal . من المفترض ان يكون نسبة الحيامن الطبيعية ٨٠-٩٠% من الحيامن الكلية. اما الاشكال الغير طبيعية فتتراوح نسبتها من ١٠-٢٠% . الاشكال الغير طبيعية تشمل الراس الصغير للحيمن، او الراس الكبي جدا، او قد يكون الرأس منشطر الى جزئين او قد يكون الذنب منشطرأو قد يكون قصيرا.

ملاحظة: في الفحص المجهري يتم كذلك التحري عن عن وجود الخلايا القيحية pus cells في حالة الاصابة بالسيلان gonorrhea والتهاب البروستاتprostatis واحيانا يوجد RBCs واحيانا epithelial واحيانا يتم الكشف عن وجود الطفيلي Trichomonas vaginalis الذي ينتقل عن طريق الاتصال الجنسي sexual transmitted .

زرع السائل المنوي culture of seminal fluid

يزرع السائل المنوي على الاوساط الزرعية الاتية :

١- blood agar و chocolate agar : تحضن incubated هذه الاوساط في candle jar لتوفير ٥-١٠% من Co_2 .

٢- وسط الـ MacConky agar : هنا تحضن الاطباق هوائيا.

ومن اهم البكتيريا التي يوجد في السائل المنوي:

Neisseria gonorrhea

Staphylococcus aureus

Coliform bacteria

Mycoplasma

فحص القشع Sputum examination

القشع هو افرازات القصبات الهوائية الشعبية يستفاد منه لتنظيف الممرات التنفسي من الدقائق الغريبة والمايكروبات العالقة، وفيه خصائص مناعية ودفاعية وهو سائل مائي ، يشكل الماء فيه ٩٥ % والباقي هو مواد بلازما ومخاطين ولعاب وبكتيريا طبيعية normal flora مع خلايا مناعية ودفاعية واحيانا مواد صلبة solid particles. ان خصائص القشع ومكوناته تعطي مؤشر عن حالة الممرات التنفسية سواء العليا او السفلى ويمكن الاعتماد عليه في تشخيص امراض الجهاز التنفسي.

جمع عينة القشع: Sputum samples collection

يجب مراعاة ما يلي عند جمع عينة القشع:

١- ان يغسل الفم بشكل اولي لازالة التلوث.

٢- يفضل جمع القشع في الصباح الباكر لان الافرازات الرئوية تكون قد تجمعت خلال الليل.

٣- قد نظطر لاستخدام مواد محسسة للسعال خاصة عند الاطفال مثل محلول NaCl بتركيز ١٠% او الماء المقطر المعقم او محلول acetyle cystein التي تحدث فقاعات هوائية تثير الشخص ليسعل coughing للتخلص منها.

٤- يجمع القشع في طبق Petri dish معقم ويمزج ويجانس بواسطة عيدان خشبية معقمة تمهيدا لفحصه.

الفحوصات:

☒ الفحص الفيزياوي physical examination

- **المظهر والتكوين: appearance and continence**

القشع مائي التكوين watery عديم اللون colorless ورائق clear وان وجود اي بريق فيه يعني وجود مواد خلوية عالقة فيه. في الحالات المرضية قد يصبح مخاطي التركيب mucoid او قيحي purulent او دموي bloody او مزيج من ذلك mucopurulant

- **اللون color**

القشع عديم اللون ووجود اي لون يعطي مؤشر مرضي فمثلا اذا كان :

- لونه اصفر yellow دليل على وجود pus cell او حالة ذات الرئة pneumonia
- اللون الاخضر green يعني وجود بكتيريا pseudomonas
- اللون البني او لون الصدأ rusty color: يعني تحليل RBCs وتحرير الهيموغلوبين Hb وتأكسده بسبب بكتريا *pneumococci* أو الكنكرين.
- اللون الاحمر المتألق bright red: يعطي مؤشر بوجود نزف heamorrhage ناجمة عن اصابة رئوية حادة او ورم خبيث.

- **الرائحة odor**

القشع عديم الرائحة. فاذا ظهرت فيه رائحة متعفنة putrid odor فيعني وجود حالة كانكرين gangrene اما اذا ظهرت رائحة الخروج fecal odor يعني وجود خراج بالكبد liver abscess اما في حالة مرض السل tuberculosis فان الرائحة تكون غير مستساغة.

☒ الفحص المجهري microscopic examination

يتم هنا تهيئة شريحتين :

١- شريحة غير مصبغة unstained film

يفحص النموذج كما هو او مزجه مع normal saline لمشاهدة الفطريات، الخلايا القيحية pus cell، RBCs

٢- شريحة مصبغة stained film

يحضر film من القشع مباشرة، تؤخذ القطع المتقيحة او الحاوية على الـpus cells وليس اللعاب saliva لان هذه القطع تحوي على البكتريا المطلوب التحري عنها، تفرش هذه القطع على السلايد فرشامتجانسا بواسطة loop ثم تترك الشريحة لتجف بالهواء ثم تثبت على النار وبعدها يتم بتصبيغها بالصبغة المطلوبة حسب نوع الحالة المشكوك بها فبكتريا السل تتطلب صبغة Zeil-nelson stain او acid fast stain اما بكتيريا الخناق Diphtheria تتطلب صبغة Albert stain والبكتريا الخرى تتطلب صبغة Gram stain

طريقة تركيز القشع: sputum concentration method

وتستخدم هذه الطريقة للكشف عن حالات التدرن الرئوي pulmonary tuberculosis الذي تسببه بكتيريا Mycobacterium tuberculosis ومحاولة الكشف عن هذه العصيات في القشع، فكرة الطريقة هي في التخلص من الالياف المخطية mucoid fibers الموجودة في القشع ، التي تمسك العصيات مانعة بذلك تحرك العصيات في القشع، وبما ان اعداد بكتيريا التدرن في القشع هي ليست كبيرة ، عليه تحتاج الى معاملة خاصة لتحريرها من القشع ولتركيزها والحصول على اعداد كافية منها ، كذلك تسخدم هذه الطريقة في حالة الشك بتلوث القشع بالبكتيريا الطبيعية normal flora الموجودة في الفم بذلك يجب ان يتم التخلص من هذه البكتيريا والتحري فقط عن بكتيريا التدرن.

* تتم هذه الطريقة بمعاملة القشع بحجم مماثل له من مادة NaOH بتركيز ٨% وخلط القشع جيدا بهذه المادة ثم وضعه في الحاضنة بدرجة ٣٧م^{o} لمدة نصف ساعة، هذه المادة ستعمل على اذابة الالياف المخاطية وتحويل القشع الى سائل وايضا تكون هذه المادة سامة للبكتيريا الطبيعية وبذلك يتم القضاء عليها، بعدها يطرد القشع مركزيا ولمدة نصف ساعة ثم يتم التخلص من السائل الطافي supernatant ويحتفظ بالراسب، يعادل الراسب باضافة بضع قطرات من حامض HCl بتركير ٤% لمعادلة تأثير القاعدة، يرج جيدا ويصبح عندئذ جاهزا لتحضير الافلام films لصبغها بطريقة acid fast stain ولزرع القشع.

زرع القشع : sputum culture

لزرع القشع يتم استخدام الاوساط الزرعية الاتية :

١- blood and chocolate agar وتحضن في ظروف هوائية مرة ومرة اخرى بوجود غاز CO_2 بنسبة ٥-١٠% وباستخدام الـcandle jar .

٢- MacConky agar : وتحضن في ظروف هوائية بدرجة ٣٧م^{o} لمدة ٢٤ ساعة لمشاهدة البكتيريا النامية.

من انواع البكتريا المسببة لالتهاب القصبات والرئتين هي:-

Streptococcus pneumonia, Streptococus pyogenes, Staphylococcus aureus, Heamophilus influenza, Pseudomonas aeruginosa, Klebsella pneumonia

أما اذا كان المطلوب زرع القشع لغرض عزل بكتيريا التدرن (**TB**) فعندئذ يزرع القشع على وسط خاص يسمى Lowenstain –Jansen medium يكون على شكل slant يحضر في قناني صغيرة. وبعد الزرع يوضع في الحاضنة بدرجة ٣٥-٣٧م^{o} لمدة ٢-٣ ايام ثم يلاحظ الزرع، اذا كانت النتيجة سالبة يترك في الحاضنة لمدة ٦

اسابيع ويفحص كل ٢-٣ ايام للتاكد من وجود البكتيريا لان هذه البكتيريا بطيئة النمو حيث ان زمن الجيل لها كبير حوالي ١٨-٢٠ ساعة لذلك زرعها يحتاج الى وقت طويل

بعد عملية الزرع وفي حالة ظهور نمو مايكروبات مرضية يتم اجراء فحص الحساسية Antibiotics susceptibility test ومن المضادات الحياتية المستخدمة للقشع هي:

Penicillin

Ampiclox

Erythromycin

Tetracycline

Cloxacillin

Amoxycillin

Cefotaxime

Cephalexin

Gentamycin

فحص المسحات Swab test

نلجا الى اخذ المسحات عند تكرار الاصا بة في منطقة محدودة من مناطق الجسم وهي على عدة انواع :

١- مسحة الفم (الحلق) Throat swab

٢- مسحة الانف Nasal swab

٣- مسحة الاذن Ear swab

٤- مسحة العين Eyes swab

٥- مسحة القيح Pus swab

٦- مسحة الجروح والحروقBurn and Wound swab

٧- مسحة المهبل Vaginal swab

٨- مسحات اخرى Other swab

شروط عمل المسحة:

١- يجب اخذ العينة (المسحة) تحت ظروف معقمة من حيث ارتداء الكفوف الطبية المعقمة او باستخدام مسحة معقمة (المسحات عبارة عن عود خشبي sticks ملفوف على راسه قطن طبي)

٢- مراعاة طريقة اخذ المسحة فبعض المسحات تؤخذ مباشرة من من المكان المصاب كمسحات الاذن والانف والعين واللوزتين والمهبل في حين ان مسحات الحروق والجروح والقيح المؤخوذة من الجلد يجب ان يعقم مكان الاصابة اولا، ثم تجفف المنطقة بالقطن المعقم الطبي وبعدها تؤخذ المسحة.

٣- يجب مراعاة اخذ المسحة من الشخص الغير خاضع للعلاج بالمضادات الحياتية اوتناول المضادات لكن انقطع عنها قبل ثلاثة ايام على الاقل لان تناول المضادات يثبط او يقتل البكتيريا الحساسة وتبقى المقاومة فقط.

٤- يجب ان يكون الفاحص ذو معرفة بالفلورا الطبيعية بالجسم فمثلا يعتبر الانف موطن طبيعي لبكتيريا *Staphylococcus auereus* ولكن تواجدها او عزلها من خراجات abscess على سطح الجلد يعتبر مرضي.

٥- يجب الاسراع في فحص المسحة لان العديد من المايكروبات حساسة للجفاف مما يتيح الفرصة لازدياد نمو الفطريات مثل الـ *Candida* مما يضلل قراءة النتائج ولذلك يفضل وضع المسحة مباشرة في وسط ناقل transport media اذا كنا متاكدين من تأخر وصول المسحة.

الفحوصات التي نجريها على المسحة

١- زرع المسحات swab culture

وهو اول اجراء نعمله بعد الحصول على المسحة حيث يتم تلقيح منطقة صغيرة على كل من طبقي اكار الدم والماكونكيblood and MacConkey agar ثم نخطط بواسطة استخدام loop طبق اكارالدم اولا ثم طبق اكار الماكونكي ثم يتم حضن الطبقين بدرجة ٣٧م^{o} لمدة ٢٤ ساعة وملاحظة شكل ولون المستعمرات المعزولة وفي حالة ظهور نمو المايكروبات المرضية فيجب اجراء فحص الحساسية للمضادات الحياتية باستخدام وسط Muller-Henton واذا لم يوجد نستخدم وسط nutrient agar .

٢- الفحص المباشر direct examination

بعد تلقيح الوسط الزرعي بالمسحة ، يمكن الان ان نجري فحص مباشرا للمايكروبات الموجودة على المسحة وذلك بتحضير شرائح زجاجية لهذه المسحة بشكل film والذي يجري بعدة طرق حسب نوع المايكوب المشكوك فيه ونوع المسحة.

١- المسحات المهبلية vaginal swab هنا يحضر فلمين ، الاول رطب wet film وذلك باستخدام normal saline ويغطى بغطاء الشريحة لمشاهدة الطفيليات ، الخمائر، كريات الدم الحمر ، الخلايا القيحية، الخلايا الظهارية.

اما الفلم الثاني فيترك ليجف ثم يصبغ بصبغة كرام gram staining للتحري عن بكتيريا *Neisseria gonorrhea* حيث تظهر بشكل ازواج ذات مظهر كلوي سواء داخل الخلايا او خارجها.

٢- مسحات البلعوم واللوزتين tonsillopharyngeal swab

هنا يتم تحضير فلم جاف dry film ويصبغ بصبغة خاصة حسب نوع المايكروب:

أ/ يصبغ بصبغة albert stain اذا كان الغرض التحري عن بكتيريا الخناق *Corynibacterium diphtherium* حيث تظهر البكتيريا بشكل يشبه الحروف الصينية

ب/ يصبغ بصبغة مقاومة للاحماض Acid fast stain اذا كان الغرض التحري عن بكتيريا السل *Mycobacterium tuberculosis*

فحوصا ت الدم blood examination

يتكون الدم من جزئين اساسيين :

١- السائل fluid

ويسمى بالبلازما plasma الذي يشكل فيه الماء النسبة الاعظم مذاب فيه مواد عضوية وغير عضوية وتشمل :

- البروتينات : مثل الالبومين albumin والفايبرينوجين fibrinogen والكلوبيولين globulin بالاضافة الى البروتينات الناقلة transport proteins .
- الاملاح salts.
- المغذيات nutrients: كالسكريات والاحماض الامينية والاحماض الدهنية.
- مخلفات الايض metabolites : كاليوريا وحامض اليوريك وبيليروبين.
- هورمونات وانزيمات

٢- الخلايا cells

- كريات الدم الحمر Red Blood Cells او Red Blood Corpuscles او erythrocytes
- كريات الدم البيض White Blood Cells او White Blood Corpuscles او leucocytes
- الاقراص الدموية platelets او thrombocytes

جمع عينات الدم blood samples collection

هناك عدة طرق لجمع عينات الدم اكثرها شيعا هي الجمع من الوريد الراسي cephalic vein او الوريد القاعدي للذراع basal vein of arm ولكن في حالات اخرى نحتاج عينة دم قليلة فيفضل جمعه عن طريق وخز الاصبع finger prick وكذلك في الاطفال احيانا يجمع من الوريد الوداجي jugular vein

* اهم النقاط الواجب اخذها بنظر الاعتبار عند جمع عينة الدم:

١- استخدام سرنجات او وخزات معقمة مع تعقيم المنطقة المراد جمع الدم منها

٢- ينقل الدم بعد ذلك في انابيب معقمة

٣- تستخدم مواد مانعة للتخثر anticoagulants -اذا كانت الغاية من جمع العينة فحص الخلايا- مثل مادة الهيبارين heparin او سترات الصوديوم الثلاثية trisodium citrate او املاح EDTA، اما اذا كانت الفحوصات المطلوبة هي للتحري عن مكونات البلازما فلا تستخدم مانع التخثر وانما تترك عينة الدم لتتخثر تاركة سائل اصفر يدعى مصل الدم serum والذي يختلف عن البلازما كونه خالي من برتين الـفايبرينوجين fibrinogen.

فحوصات الدم blood test

عينة الدم تعد من اكثر العينات التي يتم اجراء الفحوصات المختبرية عليها لما لها دلالات ومؤشرات لكثير من الحالات المرضية لذلك تم تصنيف هذه الفحوصات الى عدة تخصصات:

1- Hematology:

- Complet blood picture(CBP) "blood film"
- Erythrocyte sedimentation rate (ESR)
- RBC count

- Packed cells volume (PCV)
- Hemoglobin estimation
- WBCs count (total and differential)
- Platelets count
- Clotting and bleeding time

2- Biochemistry:-

- Sugar, Urea, uric acid, creatine, cholesterol, triglyceride, LDL, HDL, bilirubin, GPT& GOT, Ca^{++}, K^{+}.

3- Endocrinology: include group of tests:-

- TSH, growth hormones, T_3& T_4, FSH, progesterone, LH, Estrogen, Prolactine, Testosterone, Insulin.

4- Serology::- include group of tests

- Widal test, rose Bengal, rheumatoid arithritis, ASOT, C reactive protein , VDRL, …….ect

5- Imunology : include group of tests:

- HLA, IgG, IgM, IgA, Tumer antigens

6- Virology: include group of tests:

- HIV, hepatitis, CMV……ect

7- bacterial diagnosis: as blood culture in case of bacteremia.

8- Cytogenetic: include Chromosomal banding (heredity diseases)

هذه بعض الفحوصات المختبرية التي يمكن اجراءها على عينة الدم لكن اكثرها شيوعا واستخداما في المختبرات التقليدية هي فحوصات hematology وbiochemistry و serology اما البقية فتحتاج الى تخصص دقيق وإمكانيات عالية.

اولا: معدل ترسيب كريات الدم الحمراء Erythrocytes Sedimentation Rate (ESR)

هو الاختبار الذي يتم بواسطته قياس معدل ترسيب كريات الدم الحمراء في انبوبة مدرجة بالمليمترات ومثبتة بصورة شاقولية ولوقت محدد (ساعة) . ويعبر عن هذا الاختبار بـ ملم/ ساعة.وهو فحص غير نوعي non specific لكن ممكن ان يعطي مؤشر بوجود بعض الامراض العضوية في الجسم .

يتأثر ال ESR بعدة عوامل وهي :

١- عدد وحجم وكثافة كريات الدم الحمراء. كلما كانت اقل عددا واصغر حجما واقل كثافة كان ال ESR اسرع كما في حالة فقر الدم

٢- مكونات البلازما وخاصة البروتينات التي تكون مسؤولة عن تكون حالة Rouleaux الرصيصات وهي حالة اصطفاف الـ RBCs الواحدة فوق الاخرى ، وخاصة الالبومين والكلوبيولين.

٣- لزوجة البلازما. لزوجة البلازما تتأثر بتركيز البروتينات العالي وخاصة الفايبرينوجين (fibrinogen) والكلوبيولين المناعي (immunoglobulins) التي يكون مستواها في الاطفال حديثي الولادة (Neonates) قليلا، بينما تكون تركيزها عالي عند الكبار.

٤- حرارة الغرفة التي يجرى فيها الفحص. درجة الحرارة تتناسب مع معدل الترسيب درجة الحرارة المثالية لاجراء الفحص هي ٢٠ -٢٥ م^{o}.

٥- عمر العينة: بعد أخذ عينة الدم وخلطها مع Oxalate، عند تركها لمدة ساعة يحدث تجعد وانكماش RBCs مما يسبب انخفاض معدل ESR،اما في حالة استخدام EDTA فممكن تأخير العينة لمدة ٦ ساعات على الاكثر.

هناك طريقتان لاجراء هذا الفحص :

- ✓ طريقة وستركرين Westergrene method
- ✓ طريقة وينتروب Wintrobe method

الطريقة الاولى هي الشائعة الاستخدام

طريقة وستركرين Westergrene method

مبدأ الفحص: قياس معدل ترسيب ال RBCs في البلازما المخففة.

المواد المستخدمة : ١. مضاد التخثر anticoagulant وهو Trisodium citrate solution

٢. ماصة خاصة بهذا الفحص Westergrene pipette المدرجة من الصفر(في اعلاها) الى ٢٠٠ (في اسفلها)

٣. حامل وستركرين Westergrene rack

العينة المأخوذة: عينة الدم الوريدي التي يجب ان تعامل مع سترات الصوديوم (مانع التخثر) لتخفيف البلازما ويضاف بنسبة (١ حجم من Anticoagulant + ٤ حجوم من الدم)

طريقة العمل:

١/ يتم اضافة ١،٦ مل من الدم الى ٠،٤ مل من سترات الصوديوم (٤حجم + ١حجم) .

٢/ تخلط بهدوء ويسحب الخليط بواسطة ماصة Westergrene الى حد إشارة الصفر.

٣/ تنقل الماصة بحذر الى مكانها المخصص في Westergrene rack وتترك بوضع شاقولي وتحت درجة حرارة الغرفة ولمدة ساعة (تجنب إجراء الاختبار تحت أشعة الشمس او في الحرارة العالية)

٤/ بعد مرور ساعة بالضبط تسجل القراءة من خلال قراءة عمود البلازما الخالي من RBCs .

الحدود (القراءة) الطبيعية: للذكور البالغين ١ – ١٠ ملم/ساعة للإناث البالغات: ٢ – ١٥ ملم/ساعة

* لا يعد هذا الاختبار تشخيص لمرض معين ولكنه مفيد في تشخيص مراحل تقدم المرض والاستدلال بواسطته لمعرفة وجود بعض الحالات الحادة والمزمنة. حيث تزداد قيمته في حالات الروماتيزم، السل، التهاب المفاصل، فقر الدم، الحمل. بينما تنخفض في حالات الحساسية وال Polycythemia.

ثانيا: فحص حجم الخلايا المتكدس Packed cells volume (PCV)

ويقصد به النسبة المئوية لحجم كريات الدم الحمراء الى حجم عينة الدم الكلية وهي نسبة خالية من الوحدات . القيمة الطبيعية لها عند الذكور ٤٧% وعند الاناث ٤٢% ويعطي هذا الفحص مؤشرا للحالات المرضية التالية:

- حالات فقر الدم Anemia حيث تقل قيمة PCV
- حالات ازدياد عدد كريات الدم الحمراء Polycythemia حيث تزداد قيمة PCV
- الاصابة بالتيفؤيد حيث يقل حجم طبقة WBCs وتسمى طبقة Buffy coat .
- سرطان الدم حيث يزداد حجم طبقة ال Buffy coat.

الطرق المستخدمة لهذا الفحص :

١. الطريقة المصغرة (Micromethod) وذلك باستخدام الانابيب الشعرية Capillary tube

٢. طريقة المكبرة (Macromethod) وذلك باستخدام انبوبة وينتروب Wintrobe tube

الطريقة الاولى هي الاكثر شيوعا واستخداما حيث تحتاج الى وقت اقل وكمية دم قليلة.

طريقة الانابيب الشعرية Capillary tube method

طريقة العمل:-

- ✓ يتم وخز الاصبع بعد تعقيمه Finger pricking بواسطة الشفرة Lancet ويتم سحب الدم بواسطة انبوبة شعرية مطلية من الداخل بمادة مانعة للتخثر EDTA لحد ثلثي طولها ثم تغلق احدى نهايتيها بواسطة الطين الاصطناعي.
- ✓ توضع في جهاز الطرد المركزي Hematocrite centrifuge وتنبذ بسرعة ٥٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ٥ دقائق حيث نلاحظ ان عينة الدم تنفصل الى ثلاث طبقات وهي كالاتي من الاسفل الى الاعلى: طبقة ال RBCs الضغوطة ، طبقة ال Buffy coat وتتكون من WBCs والصفيحات الدموية، طبقة البلازما العليا.
- ✓ توضع الانبوبة الشعرية على مسطرة خاصة مدرجة بحيث تثبت النهاية السفلى (حافة الطين) على الخط الاسفل للورقة او المسطرة والنهاية العليا (نهاية عمود سائل البلازما) على الخط العلوي لها.
- ✓ نقرأ حجم RBCs المضغوطة ونسجل القيمة كنسبة مئوية والتي تشير الى قيمة (PCV) .

ثالثا: تعيين كمية الهيموغلوبين في الدم Estimation of Hb in blood

يعتبر الـ Hb هي الصبغة التنفسية التي اليها يعود لون الدم الاحمر والتي تتواجد داخل كريات الدم الحمراء وتتكون من الناحية التركيبية من جزء وتتكون من الناحية التركيبية من جزئين اساسيين ، جزء بروتيني وهو الكلوبين وجزء غير بروتيني وهو الـ Heam ويوجد ال Hb بالدم بعدة اشكال :

- هيموغلوبين مختزل Reduced Hb $Hb\text{-}Fe^{+2}$
- هيموغلوبين مؤكسج oxy-Hb
- هيموغلوبين مؤكسد Oxidized Hb (Methemoglubin)

- كاربوكسي هيموغلوبين Carboxy-Hb

القيم الطبيعية للـ Hb عند الذكور gm/dl ٢,٥ ± ١٥,٥ وعند الاناث gm/dl ٢,٥±١٤

تقل كمية الـ Hb في حالة فقر الدم Anemia وتزداد في حالات Polycythemia ويمكن تقديره بعدة طرق منها:

١. طريقة ساهلي Sahli method
٢. طريقة Cynomethemoglubin
٣. طريقة الانابيب الشعرية Capillary tubes method

الطريقة الاولى هي شائعة الاستخدام.

طريقة ساهلي Sahli method

مبدا عمل هذه الطريقة يعتمد على تحويل الـ Hb (بجميع اشكاله :oxy-Hbأو carboxy-Hb او Hb reduced او Methemoglubin) الى مركب الهيماتين الحامضي Acid hematin بأستخدام حامض HCl حيث يتحول اللون الى البني الفاتح وتقارن شدته اللونية مع لون قياسي وتحسب كمية الـ Hb .

عدة الفحص تتكون من :

- صندوق حاوي على ٣ انابيب اثنان جانبيان مثبتان مطليان بلون بني فاتح وتسميان بأنبوبتي المقارنة القياسية ، والثالثة وسطية متحركة يجرى فيها الاختبار وتسمى بانبوبة الفحص وتكون عليها نوعان من التدريجات : بالنسبة المئوية وبالغرام/ دسي لتر
- ماصة الـ Hb-pipette ذات حجم ٢٠ مايكروليتر .
- محرك زجاجي Glass Starrier
- قنينة صغيرة تحتوي على ٠,١ عياري حامض HCl مزودة برأس ذي قطارة.

طريقة العمل:

١- ضع كمية قليلة من من حامض الـ HCl في الانبوبة المدرجة (الى حد العلامة ٢٠%)
٢- يعقم الاصبع باستخدام قطعة من القطن مشبعة بالكحول كما وتعقم الابرة على لهب وننتظر حتى تبرد
٣- يتم وخز الاصبع وخزة قوية وسريعة بحيث تخرج قطرة دم كبيرة
٤- يسحب بالمص الخفيف قطرة الدم بواسطة الماصة المدرجة الى حد العلامة (٢٠)
٥- اذا كانت كمية الدم المسحوبة فوق هذه العلامة فيمكن التخلص بسهولة من الكمية الزائدة بوضع نهاية الماصة على ورق ترشيح الى ان ينخفض مستوى الدم الى العلامة ٢٠
٦- يتم نقل الدم حالا الى الانبوبة المدرجة الحاوية على حامض الـ HCl
٧- يتم سحب كمية من الحامض الى داخل الماصة لغسلها واعد ذلك بضع مرات واترك المزيج لمدة ١٠ دقائق.
٨- بعدها يتم اضافة حامض الـ HCl على شكل قطرات مع الخلط باستخدام المحرك الزجاجي الى ان يتكون لون بني ثابت نتيجة لتحول جميع اشكال ال Hb الى الهيماتين الحامضي وهكذا نستمر باضافة الحامض ان يكون لون الهيماتين الحامضي مطابقا للون الزجاجة القياسي

ملاحظة: يجب مسك الجهاز مقابل الشباك ليسهل تحديد شدة اللون

٩- يترك المزيج لمدة دقيقة بعد اضافة اخر قطرة تعادل اللونان ، بعدها يؤخذ معدل القراءتين كنتيجة نهائية

الحد الادنى للنسبة المئوية المقبولة والتي تعد طبيعية هي ٨٠% او الكمية الطبيعية هي ١٥غم/دل والحد الادنى الذي يمكن ان يعتبر طبيعيا ١٢غم/دل او ٦٤%.

تعدد الكريات الدموية: Blood cells count

كثيرا ما تدعو الحاجة الى معرفة عدد الكريات الحمرRBCs وكذلك عدد الانواع المختلفة من الخلايا البيض WBCs. ويمكن انجاز ذلك بالرغم من كثرة عدد ال RBCs (حوالي ٥ مليون / مايكروليتر من الدم) بسهولة وذلك بطريقة التخفيف Dilution method .

لقد شاع في السنوات الاخيرة استعمال اجهزة الكترونية لعدّ ال RBCs وال WBCs وتعرف بعدادات الخلايا الدموية Electronic blood cells counters . مثل عداد كولتر(Coulter counter) توضع فيه عينة من الدم ويضغط على زر فتبرز ارقام تمثل اعداد الكريات الحمراء في مايكروليتر واحد وارقام اخرى تمثل اعداد الخلايا البيض بالآلاف في مايكروليتر واحدٍ.ولكن الجهاز التقليدي الذي لازال مستخدم في اكثر المختبرات هو مقياس الخلايا الدموية Haemocytometer .

ولان هناك مواد كثيرة وتكون بتراكيز مختلفة موجودة في الدم لذا يجب ان تخفف عينة الدم قبل عملية العدّ. ومن مواصفات المحاليل المخففة هي قدرتها على:

- ✓ تخفيف عينة الدم.
- ✓ تحلل الخلايا الغير مطلوبة.
- ✓ تصبغ الخلايا المراد عدّها.

تسجل نتيجة حساب الخلايا الدموية على اساس عدد الخلايا لكل مليمتر مكعب (NO. of cells / mm^3) أو لكل مايكروليتر(NO. of cells / µl).

تعداد كريات الدم الحمراء: Red blood cells count

كريات الدم الحمراء Red blood cells or Erythrocytes هي خلايا قرصية الشكل صغيرة قطرها ٧,٥ مايكرون خالية من النواة مملوءة بصبغة الهيموغلوبين (الصبغة التنفسية) تنتج من نخاع العظم وتخرج الى الدورة الدموية ،وعندما يصبح عمرها ١٢٠ يوما يتم تكسيرها في الطحال والكبد.

تتغاير قيمة RBCs باختلاف العمر والجنس والتغذية والموقع من مستوى سطح البحر والنشاط والفعالية.

ففي الذكور قيمتها ٤,٥ -٦,٥ ×١٠^٦ /ملم^٣ وفي الإناث قيمتها ٣,٥-٤,٥ ×١٠^٦ /ملم^٣ .

ان حالة الزيادة في عدد ال RBCs تسمى polycythemia بينما حالة النقصان تسمى Anemia ويمكن ان تلعب الاسباب الاتية دورا مهما في اعطاء عدد غير طبيعي للكريات الحمراء منها:

١- نزف الدم الوراثي ٢- تضخم الطحال ٣- سرطان الكبد ٤- سرطان الدم
٥- سرطان الكلية ٦- اعتلال نخاع العظم .

طريقة العمل:

- تحضر الشريحة الخاصة لهذا الغرض والمسماة Haemocytometer slide وهي عبارة عن شريحة زجاجية سميكة عليها شق بشكل حرف **H** وفيها غرفتان للعدّ counting champers كل غرفة مقسمة الى مربعات كبيرة طول ضلع المربع ١ملم وحجمه ٠,١ ملم^٣ ويقسم كل مربع الى ١٦ مربع متوسط ، يوجد مربع اخر كبير تكون مربعاته مقسمة الى ٢٥ مربع صغير هذ المربع هو الذي يستخدم لحساب ال RBCs اما المربعات التي تقع في أركانه الأربع فتستخدم لحساب ال WBCs .
- تهيأ الشريحة بلصق غطاء الشريحة على غرفتي العدّ
- يوخز الاصبع (finger pricking) للحصول على قطرة دم كبيرة ويتم سحبها بواسطة الماصة ذات الخرزة الحمراء لحد العلامة ٠,٥

- يكمل الحجم الى العلامة ١٠١ من الماصة بسحب المحلول المخفف diluting solution والمسمى محلول Haym's solution .يحافظ هذا المحلول على اوزموزية ال RBCs بحيث لا تنكمش ولا تنفجر وكذلك يمنع حدوث التخثر.
- يمزج المحلول بمسك الماصة بين السبابة والابهام واقلبها ٤-٦ مرات ثم تخلص من بضع قطرات
- قرب حافة الماصة من حافة غطاء الشريحة ، سوف ينساب المحلول بالخاصية الشعرية ليملأ غرفتي العدّ
- ترك الشريحة لتستقر حركة الكريات فيها ولمدة ٢-٣ دقائق ثم احسب عدد ال RBCs في خمس مربعات متوسطة الحجم في المربع الكبير المخصص لحساب كريات الدم الحمر ويتم تطبيق المعادلة:

$$RBCs/\ mm^3 = N \times 5 \times \text{Dilution factor} \times \text{volume factor}$$

حيث ان :

N = مجموع ال RBCs في ٥ مربعات

٥ = نضرب × ٥ لان المربع الكبير فيه ٢٥ مربع متوسط الحجم.

Dilution factor : هو معامل التخفيف حيث تم تخفيف الدم في الماصة وبمقدار ٢٠ مرة

Volume factor : معامل الحجم الذي يساوي ١٠ لان المعادلة تحسب ال RBCs في ١ ملم^3 بينما حجم المربع الكبير يتسع لـ ٠،١ملم^3 لذلك × ١٠

ستكون المعادلة النهائية : $RBC/mm^3 = N \times ٥ \times ١٠ \times ٢٠$

$= N \times ١٠٠٠$

تعداد كريات الدم البيضاء: White blood cells count

كريات الدم البيضاء (white blood cells or leucocytes) هي خلايا خاصة بيضاء اللون لانها تكون فاقدة للهيموغلوبين Losing Heamoglubin ، حجمها اكبر من حجم ال RBCs تمتلك نواة. وظيفة هذه الخلايا حماية الجسم من الميكروبات وإزالة الخلايا الميتة من الأنسجة بعملية البلعمة Phagocytosis عددها في الذكور والاناث على حد سواء ٤-١١ ×١٠^3 /ملم^3 .

تصنف ال WBCs اعتمادا على تصبيغها الى نوعين من الخلايا :

- ❖ الحبيبية Granulocytes : تحتوي على حبيبات سايتوبلازمية كبيرة
- ❖ اللاحبيبية A granulocytes : تحتوي على حبيبات سايتوبلازمية صغيرة جدا لا يمكن رؤيتها بالمجهر الاعتيادي .

النوع الاول يقسم الى ٣ انواع اعتمادا على تفاعلها مع الصبغة:

١- العدلة Neutrophil ٢- القعدة Basophil ٣- الحمضة Acidophil

النوع الثاني يقسم الى مجموعتين:

١- الوحيدة Monocyte ٢- اللمفية Lymphocyte

طريقة العمل :

- تحضر الشريحة الخاصة Haemocytometer slide.
- تهيأ الشريحة بلصق غطاء الشريحة على غرفتي العدّ
- يوخز الاصبع (finger pricking) للحصول على قطرة دم كبيرة ويتم سحبها بواسطة الماصة ذات الخرزة البيضاء لحد العلامة ٠,٥
- يكمل الحجم الى العلامة ١١ من الماصة بسحب المحلول المخفف diluting solution والذي يتكون من ٢% حامض الخليك الثلجي ملون بقطرت من صبغة Gentian violet حيث يساعد هذا المحلول بالاضافة الى تخفيف الدم على

تكسير الـ RBCs وإتاحة المجال لعدّ الـ WBCs كما ان هذا المحلول يصبغ الحبيبات السايتوبلازمية فيساعد في سهولة رؤيتها وحسابها .

- يمزج المحلول بمسك الماصة بين السبابة والابهام واقلبها ٤-٦ مرات ثم تخلص من بضع قطرات
- تقرّب حافة الماصة من حافة غطاء الشريحة ، سوف ينساب المحلول بالخاصية الشعرية ليملأ غرفتي العدّ.
- تترك الشريحة لتستقر حركة الكريات فيها ولمدة ٢-٣ دقائق ثم احسب عدد الـ WBCs في المربعات الأربعة الكبيرة الحجم ويتم تطبيق المعادلة:

$WBCs/\ mm^3 = N/4 \times 10 \times 20$

حيث ان Nهو مجموع الـ WBCsفي ٤ مربعات وال ١٠ هي معامل الحجم وال٢٠ هي معامل التخفيف.

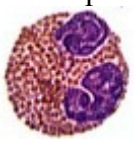
والمعادلة النهائية ستكون : $WBCs/\ mm^3 = N \times 50$

زيادة عدد ال WBCsعن الحد الطبيعي تسمى Leukocytosis والتي تحدث اما لحالات فسلجية او مرضية كما في حالة زيادتها عند الاطفال حديثي الولادة Neonates ، حالة الحمل Pregnancy والتمارين الشديدة sever exercise ، أو في حالات الحمى fever، وفي الحالات المرضية الاخرى مثل الجلطة القلبية Heart attack، الفشل الكلوي Kidney failure وحالات السرطان Cancer .

اما حالة نقصان عدد ال WBCs عن الحد الطبيعي فتسمى Leukopenia ، وحالة النقصان هذه بسبب ان الجسم لا تنتج كميات كافية من WBCs بعد تناول العلاجات الكيماوية Chemotherapy او العلاج بالاشعة Radiotherapy أو قد تكون بسبب اعتلال نخاع العظم او في حالة الاصابات الفيروسية مثل AIDS .

Differential counts of white blood cells العد التفريقي لكريات الدم البيضاء

Cell Type	Blood Conc.	Basic Function	Major Features	Lifespan
Red Cell = Erythrocyte	$5x10^6/\mu l$, 45% of blood vol.	O_2 and CO_2 transport	biconcave, no nucleus or organelles, stain pink w. eosin, 7.5µm diam.	120 days
Platelet = Thrombocyte	$3x10^5/\mu l$	clotting	small cell fragments, granules store mediators of clotting, 2-3µm diam.	10 days
White Cells = Leukocytes				
Granulocytes:				
Neutrophil = PMN = Poly	6,000/µl	phagocytize bacteria,	multilobed nucleus,	< 1 day in blood,

		secrete inflammation mediators	azurophil granules (red/purple), pink specific granules (hardly visible) 12-15µm diam.	1-2 days in tissues
Eosinophil 	200/µl	attack parasites	bilobed nucleus, many large brick red specific granules, crystal inclusions, 12-15µm diam.	< 1 day in blood, weeks in tissues
Basophil	50/µl	cause rapid increases in blood vessel permeability, immediate hypersensitivity	irregularly lobed nucleus, obscured by large deeply basophilic specific granules, 12-15µm diam.	< 1 day in blood, hours in tissues
Agranulocytes:				
Lymphocyte	2,000/µl	B cells: differentiate into plasma cells and secrete specifc antibodies T cells: recognize cell associated antigens and lyse foreign or virus infected cells, regulate other immune cells	round dark blue nucleus, thin rim of gray/blue cytoplasm, 7-9µm diam.	Years
Monocyte	400/µl	become tissue macrophages which scavenge debris, present antigen to lymphocytes	oval to kidney nucleus eccentrically located, chromatin more lacy than in lymphocytes, gray-blue cytoplasm, 12-17µm diam.	days in blood, years in tissues as macrophages

يعتبر العد التفريقي لل WBCs جزء من اختبارات صورة الدم الكاملة C. B. P المهمة التي تضمن تحضير وصبغ ومن ثم فحص مسحة الدم الموجودة على شريحة زجاجية ويقصد به حساب النسبة المئوية لكت نوع من انواع الخلايا البيضاء في الدم المحيطي والذي يمكن ان يعطي مؤشر لبعض الحالات المرضية.

طريقة العمل :

١. يتم وخز الاصبع finger pricking للحصول على قطرة دم ويتم وضعها على شريحة زجاجية Slide نظيف وجاف، بحيث تبعد قطرة الدم ١سم عن احد حافتي الشريحة.
٢. يتم استخدام شريحة زجاجية Slide اخرى تسمى بالفارش Spreader حيث تقرب حافتها الناعمة من القطرة بزاوية ٤٥ وبعد ان تنتشر قطرة الدم على حافة ال slide Spreader يتم سحب الفارش والقطرة الملتصقة به الى الخلف بسرعة معتدلة بحيث تظهر مسحة الدم بشكل بصمة الابهام (شكل حرف D) وبعدها تترك لتجف.
٣. تغطى المسحة بصبغة كيمزا Giemza او صبغة ليشمان Leishman او صبغة رايت wright stain ويجب ان تثبت بالكحول المثيلي حيث تضاف قطرات منه الى المسحة (يعمل الكحول على مسخ بروتينات الدم Denaturation وتثبت المكونات) بعد التصبيغ تفحص بالمجهر تحت العدسة الزيتية.
٤. نعمل جدول ونسجل فيه عدد الخلايا ونحسب ما مجموعه ١٠٠ خلية دم بيضاء والتي يمكن تمييزها كالاتي:

العدلة Neutrophil:

- كبيرة ونواتها مفصصة ٣ – ٥ فصوص
- حبيباتها خشنة وناعمة ذات لون ارجواني
- نسبتها الطبيعية ٥٠ – ٧٠ % من ال WBCs
- تزداد نسبتها عن الحد الطبيعي في حالات الاصابة البكتيرية

الحمضة Esinophil:

- كبيرة الحجم ونواتها ذات فصين مرتبطين بخيط كروماتيني رفيع
- حبيباتها خشنة حمراء اللون
- نسبتها الطبيعية هي ٤ - ٦% من عدد ال WBCs الكلي.
- تزداد نسبتها عن الحد الطبيعي في حالة الامراض الطفيلية.

القعدة Basophil:

- كبيرة الحجم ، نواتها تشبه حرف S
- حبيباتها ناعمة زرقاء اللون
- نسبتها الطبيعية هي ١% من ال WBCs الكلي
- تزداد اعدادها عن النسبة الطبيعية في حالة امراض الحساسية

الوحيدة Monocytes:

- اكبر الانواع حجما نواتها تشبه حبة الفاصوليا
- السايتوبلازم خالي من الحبيبات رصاصي اللون او ازرق فاتح
- نسبتها الطبيعية هي ٣ – ٩% من عدد ال WBCs الكلي.
- تزداد اعدادها عن النسبة الطبيعية في حالات الالتهابات المزمنة والسرطانات.

اللمفاوية Lymphocytes:

- اصغر الانواع وهي بحجم ال RBCs تقريبا نواتها كبيرة تملأ معظم حيز الخلية
- تكون ذات لون بنفسجية
- نسبتها الطبيعية هي ٢٥ – ٣٥% من مجموع ال WBCs الكلي
- تزداد اعدادها عن النسبة الطبيعية في حالات الاصابات الفايروسية وسرطان الدم Leukemia

هناك طريقة اخرى لاجراء اختبار تعداد WBCs

- يتم سحب ٠,٤ من المادة المخففة والمسماة (Turk's solution) في انبوبة اختبار.
- بعد ان يتم اخذ عينة الدم يتم تحريكها (في الأنبوبة التي تحتوي على مانع تخثر) بهدوء لضمان خلطها مع مانع التخثر.
- تسحب عينة الدم بواسطة ماصة ساهلي (Sahli pipette) الى حد العلامة ٠,٠٢
- يتم اضافة عينة الدم (الموجودة في ماصة ساهلي) الى انبوبة الاختبار الحاوية على المادة المخففة (Turk's solution) وتحرك بلطف لمدة ١٥ – ٣٠ ثانية.
- تهمل القطرات الاولى لتجنب الفقاعات.
- الآن عينة الدم جاهزة لتوضع على شريحة العدّ. يجب التأكد من خلو العينة من الفقاعات.
- عند تقريب فتحة الماصة من حافة الشريحة سوف تنساب عينة الدم لتنتشر بين الشريحة والغطاء cover slip .
- توضع الشريحة تحت المجهر ليتم حساب الـ WBCs في المربعات الاربعة الركنيـــة تحت القوة x١٠ ويتم حساب عدد الـ WBCs اعتمادا على العلاقة الرياضية الآتية:

$$WBCs\ (cell/\ ml) = N \times D \times 10$$

N = Cell counted in 4 corners squares

D = diluting factor (=20)

10 = volume factor

Blood Group System

نظام فصائل الدم

قبل اكتشاف نظام فصائل الدم ، كانت هناك محاولات فاشلة لعمليات نقل دم . بعد الدراسة والبحث تبين أن سبب الموت الحاصل نتيجة عمليات نقل الدم الفاشلة هو تجمع كريات الدم الحمراء RBCs مع بعضها البعض وانفجارها ومن ثم تخثرها في الأوعية الدموية، وسميت هذه الحالة بـ Transfusion reaction. في عام ١٩٠٥ اكتشف العالم كارل لاند شتاينر ان سبب هذه الحالة هو التفاعل الحاصل بين المستضدات (Antigens وتسمى كذلك Agglutinogen) مع الأجسام المضادة (Antibodies وتسمى أيضا Agglutinin). غشاء الـ RBCs يحتوي على (Ags) مكون من جزيئات الـ glycoprotein وهي خاصة بكل شخص، والبلازما تحتوي على (Abs) ذات تركيب بروتيني. على اساس الـ (Ags) الموجود على سطح الـ RBCs ، هناك ٦٠٠ نوع من هذه الـ (Ags) نظمت في ٢٢ نظام وأحد هذه الانظمة هو Blood Group System الذي يتكون بدوره من نظامين هما ABO & Rh blood group systems .

١. **ABO blood group system**:

هذا النظام يعتمد على وجود مستضدين (2Ags) على سطح الـ RBCs والجدول الاتي يوضح فصائل الدم عند الانسان والمستضدات على سطح الـ RBCs والاجسام المضادة الموجودة في البلازما اضافة الى الطراز الوراثي لكل فصيلة:

Blood groups	Ags on RBCs	Abs in serum	Genotypes
A	A	b	I^AI^A, I^Ai
B	B	A	I^BI^B, I^Bi
AB	A & B	____	I^AI^B
O	____	a & b	ii

من خلال الجدول، نستطيع ان نعرف انه في نفس الصنف يوجد (Abs) في المصل يختلف عن نوع الـ (Ags) المحمولة على الـ RBCs وذلك لغرض منع حدوث عملية التلازن التلقائي Spontaneous agglutination بين المستضد والضد وبالتالي تحلل RBCs وتكون الخثرة Clotting في الاوعية الدموية.

في حالات نادرة هناك عدم تطبق بالنسبة لنظام الـ ABO system بين الام وجنينها ولكن هذا لا يشكل خطورة على الجنين لانه:

- الجنين يمتلك (Ags) قليلة جدا كما انها ليست متطورة بصورة كافية لتحفيز الجهاز المناعي عند الام.
- اكثر الـ (Abs) عند الام هي من نوع IgM الذي يكون كبير الحجم وبذلك هي لا تمر عبر المشيمة Placenta للتفاعل مع (Ags) الموجودة على RBCs في الجنين.

٢. **Rh blood group system**

يعتبر العامل الريسي من انظمة الدم المهمة الذي اكتشف سنة ١٩٤٠ من قبل العالمان لاند شتاينر و فاينر. حيث لاحظا تكون (Abs) في دم الارنب عند حقنه بدم نوع من القرود وهو قرد الريسRhesus monkey. بامكان هذه الـ Abs ان تحدث تجلطا في دم القرد وعليه فان RBCs لهذا القرد تحمل Ags خاص يدعى (Rh – Ags) او D - Ags وقد وجد ان غالبية البشر (٨٥%) تملك هذا الـ Ag أي ان دمهم من نوع Rh^+ وعند انعدام هذا ال Ag في دم بعض الافراد يقال ان دمهم من نوع Rh^- ونسبتهم (١٥%). ان دم الافراد من نوع Rh^- لا تحوي ال (Rh-Ag) وبالتالي فان مصل دمهم يخلو من Abs للـ Rh ، غير انه بامكان

هؤلاء الافراد انتاج ال Abs الخاصة بهذا العامل اذا نقل اليهم دم من افراد Rh^+ ، اذ تؤدي عملية نقل دم للمرة الثانية من شخص Rh^+ الى اخر Rh^- - سبق وتكون في دمه Abs للعامل Rh – الى تجلط الدم وبالتالي موت المستلم .

وقد لوحظ ان انتاج الـ Ab يمكن ان يحدث في بعض حالات الحمل بنسبة ١:١٠٠٠ تقريبا مما يؤدي الى موت الجنين لان الشعيرات الدموية في الكبد تنسد ببقايا الـ RBCs المتجلطة مما يسبب مرض اليرقان (Jaundice) وقد تحدث الوفاة قبل الولادة او بعدها مباشرة اذا لم تتخذ الاجراءات المناسبة حالا وتسمى هذه الحالة بـ Hemolytic disease of Neonates (HDN) لا تحدث هذه الحالة الا اذا كانت الام تحمل دم من نوع Rh^- وكان دم الجنين من نوع +Rh (ان يكون دم الاب +Rh)

عند حدوث تشقق في المشيمة (او عند فصلها عن جدار الرحم خلال عملية الولادة الاولى) يحدث نزف يسمح بانتقال الدم من الجنين الى الام التي يبدأ دمها بتكوين الاجسام المضادة ثم تنتقل هذه الاجسام الى الجنين (اذا كان العيب مشيميا) وتدمر الـ RBCs فيه الحاملة للـ (Rh-Ag) أي +Rh او ان تبقى في دم الام فيظهر تاثيرها في الحمل التالي.

وقد وجد العالم كلارك ان حقن الام عقب الولادة مباشرة بمادة مضادة لـ Rh (Anti-Rh) يساعدها على التخلص من أي دم كان قد تسرب اليها من الجنين وبذلك لا ينتج دمهم الاجسام المضادة ويزول الخطر عند الطفل في الحمل التالي.

مبدأ هذا الفحص:

يعتمد هذا الفحص على اساس التفاعل الحاصل ما بين المستضد والاجسام المضادة وملاحظة التلازن الحاصل نتيجة التفاعل.

المواد المستخدمة:

١- Blood group plate or microscopic slide

٢- anti-A, anti-B, anti-D solutions.

٣- Starrier

عينة الدم تأخذ اما من الاوعية الشعرية الدموية مباشرة او توضع في انبوب يحوي مانع للتخثر لحين استخدامها.

طريقة العمل:

هناك عدة الفحص Kit خاصة لاجراء هذا الفحص وهي عبارة عن Abs جاهزة معبئة في ٣ عبوات (anti-A, anti-B, anti-D) وتتم طريقة الفحص كالاتي:

١. تؤخذ ٣ قطرات دم من الشخص المراد معرفة فصيلة دمه وذلك عن طريق وخز الاصبع بعد تعقيمه وتجفيفه وتوضع هذه القطرات على مسافة واحدة.
٢. نضع على القطرة الاولى من الدم قطرة من anti-A وعلى القطرة الثانية نضع anti-B والقطرة الثالثة نضع عليها قطرة من anti-D.
٣. نقوم بمزج كل قطرة من الدم مع الـ Ab المضاف اليها بواسطة عود خشبي والعود المستخدم لمزج القطرة الاولى لا يستخدم لمزج القطرة الثانية.
٤. ننتظر من ٢ – ٥ دقائق ونلاحظ التلازن وتكون القراءة كالاتي:

- اذا حدث تلازن في القطرة التي امتزجت مع anti-A ولم يحدث تلازن مع القطرة الثانية التي امتزجت مع anti-B فصنف الدم هو A.
- اذا حدث تلازن في القطرة التي امتزجت مع anti-B ولم يحدث تلازن مع القطرة الثانية التي امتزجت مع anti-A فصنف الدم هو B.
- اذا لم يحدث تلازن في كلا القطرتين فالصنف هو O .
- اذا حدث تلازن في القطرة الثالثة التي اضيف لها anti-D، هنا يكون +Rh
- اذا لم يحدث تلازن في القطرة الثالثة التي اضيف لها anti-D، هنا يكون -Rh

ملاحظات عامة:

أ- تخزن الـ Kits في الثلاجة بدرجة ٢-٨ م^{o} .

ب- عند استعمال الـ kits يخرج من الثلاجة وتترك بدرجة حرارة الغرفة لفترة.

ت- العبوات التي تحوي على Abs ،عند فتحها لاجراء الفحص يجب غلقها بسرعة لان حجم المحلول يقل بسبب تبخره.

ث- قبل استعمال العبوة يجب ان ترج جيدا لكي تتجانس.

زمن النزف bleeding time

ويقصد به الزمن اللازم بعد حدوث الجرح وقطع الوعاء الدموي وحتى تكون السدادة plague بسبب تجمع الاقراص الدموية لغلق الفتحة تحت تأثير بعض الوسائط الكيمياوية مثل مادة prostaglandin . لذلك فان اي دواء يمنع تخليق هذه المادة سوف لا يسمح بانقطاع النزف مثل الاسبرين لذلك لايجوز تناوله من قبل النساء اثناء الدورة الطمثية.

مقدار هذا الزمن الطبيعي هو من ٣-٧ دقائق ويزدادا في حالة نقصان الاقراص الدموية اوخلل في مسلك تخليق الوسائط الكيماوية.

يجرى هذا الفحص بوخز صيوان الاذن بابرة معقمة ثم نبدأ باخذ قطرة الدم النازلة كل ١٥-٣٠ ثانية بواسطة ورقة ترشيح الى ان ينقطع النزف ثم نحسب عدد القطرات المأخوذة على ورقة الترشيح ونضربها في مقدار الفاصل الزمني فمثلا لو كان عدد القطرات المأخوذة على ورقة الترشيح ٨ و مقدار الفاصل الزمني ٣٠ ثانية، فبكون زمن النزف =٨×٣٠=٢٤٠ ثانية اي ٤ دقائق.

زمن التخثر clotting time

هو الزمن المحصور بين بدأ الجرح وتكون الخثرة thrombus الذي يحول الفايبرينوجين fibrinogen الى الفايبرين fibrin والذي بدوره يكون بشكل خيوط ليفية تحصر بينها كريات حمر مكونا شبكة تغلق الفتحة وقيمته الطبيعية ٥-١٥ دقيقة. من العوامل التي تؤثر على الية تخثرالدم:

١- نقص فيتأمين K ٢- نقص الكالسيوم. ٣- أمراض الكبد والكلية.

٤- مرض نزف الدم الوراثي hemophilia ٥- انسدادا القناة الصفراوية.

طريقة إجراء الفحص تتم بواسطة الأنابيب الشعرية من النوع الغير مطلية بمادة الهيبارين ذات العلامة الزرقاء non heparinized capillary tubes

ملاحظة: النوع المطلي بمادة الهيبارين ذات العلامة الحمراء يستخدم في فحص PCV.

١- يتم وخز الإصبع والحصول على قطرة الدم ويتم سحبها بواسطة الانبوبة الشعرية

٢- نبدا بقطع جزء من الأنبوبة كل ٣٠ ثانية ونلاحظ هل تكوّن خيط لزج بين القطعة المكسورة والاصل، عند ذلك نحسب عد القطع المكسورة ونضربها في مقدار الفاصل الزمني ثم نضيف لها الوقت الاضافي المستغرق في ملئ الأنبوبة الشعرية .

زمن التخثر = (عدد القطع ×٣٠ ثا) + الوقت الإضافي

فمثلا : عدد القطع ٦، كل ٣٠ ثانية، والوقت الاضافي كان ٩٠ ثا

(٦×٣٠)+٩٠= ٢٧٠ ثا، اي انه ٤٥ دقيقة

اهم العوامل التي تطيل من زمن التخثر عن الحد الطبيعي هي حالة النقص الحاصلة في عوامل التخثر والتي تشمل أكثر من ١٣ عامل بضمنها فيتأمين k وايونات الكاليسيوم و الثرومبين و الفايبرينوجين و..... الخ.

Serology test

التلازن او التراص Agglutination test

التلازن او التراص :

هو تجمع مرئيvisible لجزيئات المستضد الغير الذائب او الجسمي particulate نتيجة التفاعل النوعي specific بين الضد (antibody) المسى بـ (agglutinin). والمستضد المسمى بـ (agglutinogen) ويكون باشكال وانواع مختلفة كما في المخطط التوضيحي لانواع التقنيات المستخدمة:

Agglutination

-Active agglutination:مثال

1- Bacterial agglutination (widal test)

2- heamagglutination (blood grouping)

-Passive agglutination

ويكون باستعمال:

1- Polysterenparticles جزيئات متعددة الستيرين

2- Pentonite

3- Charcol

4- Erythrocytes

Passive heagglutination

-Passive direct heagglutination

مثال التراص الدموي المنفعل

Trepanoma Passive heagglutination (TPHA)

-Passive indirect heagglutination

مثال التراص الدموي غير المنفعل

Indirect coomb's test

المستضد يمتز (adsorbed) على سطح كريات الدم الحمر في حالة الـ Heamagglutination.

استعمال تقنية التراص

١- تشخيص الجراثيم microbial diagnosis.

٢- تشخيص التجمع المصلي seroaggregaton كما في اختبار الويدال widal test وفي اختبار Rose Bengal test .

٣- في تشخيص مجاميع الدم.

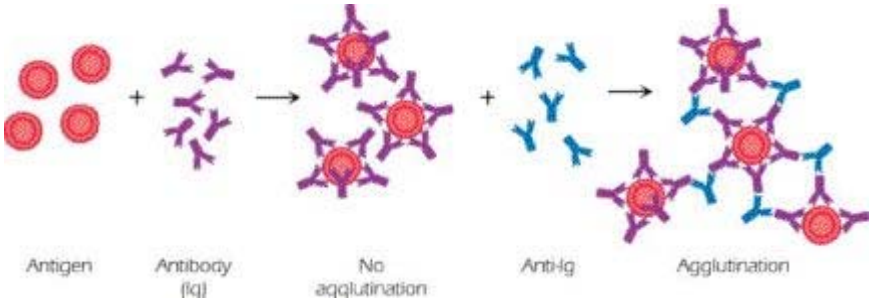
مخططات توضيحية للتلازن:

١- تلازن جرثومي مباشرdirect bacterial agglutination

٢- تلازن غير مباشرindirect or passive agglutination

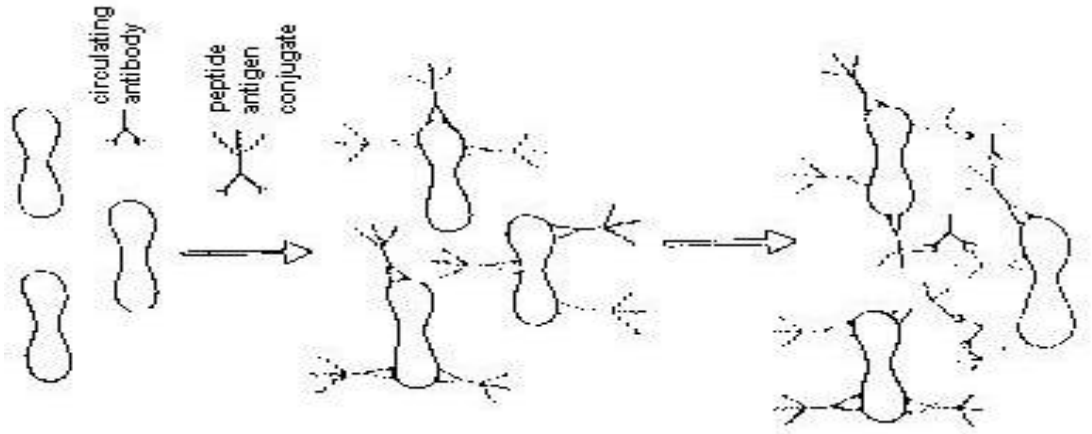
٣- تراص دموي مباشر direct heamagglution

٤- تراص دموي غير مباشر (اختبار coomb's) حيث يحصل indirect or passive agglutination .



كما في اختبار كومز

تراص دموي غير مباشر



تلازن جرثومي مباشر

C- reactive protein (CPR)

هو عبارة عن بروتين يوجد في مصل المرضى المصابين بالـ pneumonia وقد اكتشف هذا البروتين من قبل العالمين francis & Tillet اللذان وجدا ان هذا البروتين يشكل معقد complex مع C- polysaccharide لبكتيريا Pneumococcus .

مميزات البروتين properties of CRP

١- هو عبارة عن بروتين غير طبيعي يوجد في مصل المرضى المصابين بالحالات الحادة acute لمختلف الامراض الحمية febrile diseases ولايوجد في دم الاشخاص الاصحاء.

٢- غير مستقر بالحرارة thermolabile.

٣- لا يمر من خلال المشيمة placenta.

٤- يزداد هذا النوع من البروتين بدرجة سريعة بعد الاصابة ويصل الى أعلى مستواه بعد ١٤-١٦ ساعة من هجوم المرض ويختفي بعد الشفاء من الحالة المرضية

☒ يوجد هذا البروتين بصورة ثابتة في حالات :

- Bacterial infection
- Acute rheumatic fever
- Acute myocardial infarction
- Wide spread malignant diseases

مبدأ الفحص Principle of test:

تعتمد فحوصات الكشف عن هذا البروتين باعتباره كأنتجين باضافة اجسام مضادة للبروتين اي (anti CRP) الي تكون مرتبطة بجزيئات اللاتكس

Latex particles coated with anti-CRP (Ab) +CRP (Ag) in the serum of patients

فعندما يتم مزج هذا الـ reagent مع الـ serum الذي يحتوي على الـ Ag مع التحريك فانه سوف يحدث تحبب وتلازن agglutination وهذا يدل على ان الفحص موجب(+) وعدم وجود التحبب دلالة على ان الفحص (-).

CRP in serum of patient samples + Anti-CRP →agglutination or aggregation (+)

يمكن ان يوجد الـ CRP بعد العمليات الجراحية surgical operations وبعد عمليات نقل الدم بكميات كبيرة after blood transfusion.

Pregnancy test

فحص الحمل:

هو عبارة عن فحص يجري للكشف عن عن حالة الحمل بعد انقطاع الدورة الطمثية للمرأة

مبدأ الفحص:

هو حالة ظهور هورمون human choroinic gonadotrophin (HCG) في الادرار او الدم blood or urine في فترة محدودة بعد الحمل.

يعتبر هورمون (HCG) مستضد (Ag) باعتباره مادة بروتينية عالية الوزن الجزيئي. يطرح هذا الهرمون من خلايا المشيمة (placenta trophoplast cells) بعد حوالي ١٠ أيام من بداية الحمل ليصل اعلى مستوى له خلال الاسبوع العاشرمن الحمل، ويبدأ بالهبوط الى ان يختفي في الاسابيع الاخيرة من الحمل.

ويمكن الكشف عن هذا الهرمون مخبريا في الادرار او الدم (أي بأخذ المصل) ويجب الامتناع عندها من اخذ العلاجات ولمدة ٣ ايام قبل اجراء الفحص لان الفحص كثيرا ما يتأثر بالادوية التي تطرح مع الادرار.

عندما تضاف جزيئات اللاتكس latex المغطاة او الممدصة بالاجسام المضادة للـ HCG الى عينة الادرار المأخوذة من المرأة الحامل فانه سوف يحدث تفاعل مرئي بين جزيئات الـlatex والـAb مع الـ HCG الذي يعتبر مستضدا مكونا التلازن او التحبب.

يوجد هناك نوعين من فحوصات التلازن للكشف عن وجود الحمل:-

1- Indirect or passive agglutination test:

HCG (Ag) in urine of pregnant weman +Anti-HCG (Ab) [after 3 min. with mixing] → agglutination (+ve)

في حالة وجود التحبب المرئي يعني ان التفاعل موجب (+ve) وبعد ٣ دقائق من التحريك وحسب تعليمات الـkit

في حالة عدم وجود التحبب المرئي يعني ان التفاعل سالب (-ve) وبعد ٣ دقائق من التحريك وحسب تعليمات الـkit

في حالة عدم وجود التحبب المرئي ولكن يكون rough suspention فيكون (±) مشكوك doutfulففي هذه الحالة يعاد الفحص بعد ايام.

2- Passive inhibition agglutination test:-

HCG in urine of pregnant + Anti-HCG (soluble) → reaction invisible + latex particle adsorbed with HCG(Ag) → (-ve) النتيجة اما ان يكون هناك تحبب والنتيجة

(+ve) اوعدم ظهور تحبب والنتيجة

طرق الكشف عن هذا الهرمون :HCG

١- طريقة اللاتكس المباشرة direct latex agglutination

٢- طريقة تثبيط التلازن passive inhibition agglutination test

٣- طريقة فحص الانبوب tube test وتعطي نتائج اكيدة بعد ٣ ايام من انقطاع الدورة الشهرية، اما طريقة اللاتكس فتعطي نتائج بعد ١٤ يوم من انقطاع الدورة الشهرية.

٤- طريقة الـELIZA عن طريق استخدام مصل المريض (serum)

٥- طريقة الـ strike card

كيفية الحصول على Anti-HCG

يؤخذ الـ HCG المنقى (المفصول) من الادرار او الدم ثم يزرق في احد الحيوانات المختبرية (كالارنب) حيث يعتبر كـ Ag ، وبعد فترة من الزمن (١٤) يوم تتكون الـ Ab في دم مصل دم الحيوان المختبري، يؤخذ دم الحيوان ويفصل منه الـ Ab للـ HCG ومن ثم يدمص على جزيئات اللاتكس latex.

يطرح هرمون الـ HCG في حالات اخرى غير الحمل:

١- في حالة الحمل العنقودي hydatid

٢- في حالة الخمل خارج الرحم Ectopic gestation

تكون قراءة النتائج كالاتي:

في حالة وجود حمل Pregnancy test (+ve)

في حالة عدم وجود حمل Pregnancy test (-ve)

فحص الويدال Widal test

يستخدم هذا الاختبار لتشخيص الامراض الحمية Febrile diseases ويقصد بالامراض الحمية هي مجموعة من الامراض الخمجية التي يصاحبها ارتفاع في درجات الحرارة (الحمى fever) والتي تكون ذات صفات مشتركة في التشخيص والاعراض وهي:

١- الحمى المعوية enteric fever

٢- حمى التيفؤيد typhoid fever

٣- داء البروسيلات Brucellosis

ان السالمونيلا ذات انماط مصلية متعددة اعتمادا على المستضد الجسمي O Ag والتي هي (A, B, C, D, E) والى ١٢٠٠ نمط مصلي اعتمادا على المستضد السوطي Flagellar antigen (H-Ag) .

الغرض من اجراء اختبار الويدال:

١- تحديد عيار الاضداد لكل من المستضد الجسمي O-Ag والسوطي H-Ag في مصل المريض او حاملي المرض.

٢- تعزيز تشخيص سبب الخمج من خلال تحديد العيارية (Titer).

٣- تحديد العيار الطبيعي normal titer بمقارنة عيارية الاضداد للحالة السريرية للمرضى والاصحاء.

٤- متابعة شدة المرض بوجود او عدم وجود العلاج.

اساس الاختبار : Principles of test

ويعتمد هذا الاختبار على التراص (التلازن) المباشر بين الخلايا الجرثومية للسالمونيلا بفعل المستضدات الجسمية والسوطية التي تظهر في مصول المرضى.

Anti-O & Anti-H (Agglutinins in serum of pateints) + Bacterial Antigens suspension (O & H Ags) →Active agglutination.

يمكن اجراء هذا الاختبار بتقنيات متعدد مختلفة:

١- تقنية تراص الشريحة Rapid slide agglutination method

وتتم من خلال:

- وضع قطرتين من مصل المريض على طرفي السلايد.
- يتم اضافة قطرة من كل من المستضدين (السوطي والجسمي) لكل قطرة من مصل المريض.
- يتم مزج كل قطرتين على حدة باستخدام عود خشبي Wood stick
- بعد الانتهاء يتم تحريك الشريحة وقراءة النتيجة بعد دقيقتين.

٢- تقنية معايرة تراص الشريحة: Slide titration method

وتتم من خلال:

- يتم سحب كميات معينة من مصل المريض بواسطة Micropipette واضعا اياها في الدوائر الخاصة بها على الشريحة و كالاتي: 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 ml
- لكل قطرة من المصل يتم اضافة قطرة من المستضد العير بواسطة ماصة خاصة و يكون فيها حجم القطرة 0.005 مع مراعاة عدم لمس القطارة pipette للمستضد مع قطرات المصل ويرج العالق جيدا.
- يمزج المستضد والمصل الموجود باستخدام العود الخشبي و لكل الحفر.
- المزيج النهائي للمصل و المستضد سيكون بالتخفيف الاتي: 1:320 ,1:60 ,1:80 ,1:40 , 1:20

- يتم تحريك الشريحة و ببطء لمدة دقيقتين وحسب إرشادات الـ Kit.
- ضع الشريحة في ضوء مناسب و لاحظ النتائج.

ويمكن تلخيص بالجدول الاتي:

المستضد الجسمي O-Ag	0.08ml serum + drop of Ag	0.04ml serum + drop of Ag	0.02ml serum + drop of Ag	0.01ml serum + drop of Ag	0.05ml serum + drop of Ag
المستضد السوطي H-Ag	0.08ml serum + drop of Ag	0.04ml serum + drop of Ag	0.02ml serum + drop of Ag	0.01ml serum + drop of Ag	0.05ml serum + drop of Ag
Titer	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320

Slide titration agglutination technique

*Salmonella typh*i	O-Ag (TO)
S. typhi	H-Ag (TH)
S. paratyphi A	AH-Ag (AH)
S. paratyphi A	AO-Ag (AO)
S. paratyphi B	BH-Ag (BH)
S. paratyphi B	BO-Ag (BO)

تكتب النتائج بشكل تقرير و لجميع المستضدات اعلاه على شكل Titer ولكل منها و فيما يلي أمثلة:

Titer / Ab type	1	2	3	4	5	6	7
TO	160	80	80	160	-	-	80
TH	640	-	-	-	-	320	640
AO	80	320	80	-	-	-	160
AH	-	640	-	-	-	160	160
BO	80	80	320	-	160	-	160
BH	-	-	640	-	-	160	160

القراءة الاولى: حالة حمى تايفؤيدية typhoid fever

القراءة الثانية: حالة حمى نظير التيفؤيدية paratyphoid A

القراءة الثالثة: حالة حمى نظير التيفؤيدية paratyphoid B

القراءة الرابعة: هناك ٣ احتمالات لتفسير هذه الحالة:

١- حمى تايفؤيدية قبل اليوم العاشر (يعاد الفحص بعد اسبوع)

٢- حالة خمج بسلالة من سلالات السالمونيلا مشاركة بتوليد Ab ضد O-Ag

٣- حالة خمج بجرثومة Yersinia بسبب حدوث تفاعل تصالبي Cross reaction.

القراءة الخامسة: نفس القراءة الرابعة عدا فقرة (١) حيث ان الاصابة حمى نظير التيفؤيد B قبل اليوم العاشر (يعاد الفحص بعد اسبوع).

القراءة السادسة: المريض ملقح بلقاح TAB قبل ٣ اشهر او مريض من فترة او مصاب من مدة طويلة و قد اصيب باصابة اخرى بـ TAB (Typhoid , Paratyphoid A, B) .

القراءة السابعة: خالة حمى تايفؤيدية typhoid fever عند مريض ملقح منذ فترة قصيرة بـ TAB.

Rose Bengal Test اختبار وردية بنكال

يستخدم هذا الاختبار في تشخيص الاصابة بالبروسيلا وبانواعها الثلاثة المتماثل مستضديا حيث من خلال هذا الاختبار يمكن معرفة وتشخيص داء البروسيلات Brucellosis حيث انه المسبب لهذا الداء هي جراثيم البروسيلا *Brucella* التي تكون على شكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام و هي تتوطن endemic في الحيوانات الحقلية حيث تنقل الخمج الى الانسان من خلال تماسه معها او عند تناول منتجاتها الملوثة كالحليب . تظهر اغلب الحالات المرضية في الذكورmale.

هناك ٤ انواع من جنس الـ Brucella وهي *Brucella abortus* في الابقار و *B.melitensis* في الاغنام والماعز و *B. suis* في الخنازيرو *B. canis* في الكلاب والانسان وتكون من النوع المعتدل . تنتقل البروسيلا للانسان عن طريق التماس المباشر مع الحيوانات او عن طريق المجرى الانفي البلعومي Nasopharynx ومن ثم الى الجهاز الشبكي البطاني endothelial system ومنه الى الدم مسببة تجرثم الدم Bacteremia.

الاعراض Symptoms

- تكون حادة في باديء الامر حيث تكون مصاحبة للحمى.
- الحمى والصداع Headache والضعف weakness والتعرق sweat.
- اعتلال عقدي لمفي lymphadenopathy و تضخم الطحال Splenomegaly.
- الام في المنطقة القطنية بالظهر Lumber . وتستمر الفترة الحادة للمرض بين ٣-١٢ شهر عند بقاء المريض من دون علاج. تتحول بعدها الى الخالة المزمنة chronic خيث يظهر على المريض الاكتئاب depression والاعياء fatique والالم العضلي anthralgia و ينتهي بالتهاب السحايا المزمن chronic meningitis و التي قد تستمر لسنين.

التشخيص Diagnosis

١- من خلال عزل الجرثومة وزعها من عينة الدم وهذا يعطي نتائج سالبة كاذبةfalse negative results بسبب طبيعة الجرثومة وطبيعة الخمج وعليه يكون التشخيص المصلي هو المعول عليه.

٢- التشخيص المصلي serological diagnosis.

٣- الاعراض السريرية clinical diagnosis من قبل الطبيب.

٤- يعتمد التشخيص المصلي على طريقة ١- التلازن المباشر direct agglutination من خلال فحص Rose Bengal test. ٢- فحص تثبيت المتمم complete fixation test. ٣- فحص الـ ELIZA. ٤- فحص الـ Immunofluorescence test .

أساس الاختبار : Principle of test

يعتمد اختبار التلازن للبروسيلا على وجود الاجسام المضادة Antibodies ضد البروسيلا في مصول المرضى التي تظهر في نهاية الاسبوع الثاني من ظهور الاعراض وتصل قمة مستواها ما بين الاسبوع (٤-٨) لتهبط الى النصف خلال الستة اشهر وقد تبقى لمدة تزيد على السنة في مصل المريض. فعند مزج قطرة من مصل المريض. فعند مزج قطرة من مصل المريض

مع قطرة من المعلق البكتيري Bacterial suspension المحتوي على جسم البكتيريا والذي يعمل كمستضد مع احتواء هذا المعلق على على صفة وردية اللون فيعطي التفاعل نتيجة موجبة، وعلى شكل تجمع حبيبي (تلازن).

Ab in patient serum + Ag in bacterial suspension= agglutination.

عدم وجود او حصول التفاعل هو دليل على سلبية التفاعل أي عدم وجود الاجسام المضادة ضد هذه البكتيريا وفي حالة وجود او يكون التفاعل موجب و لمعرفة titer لهذه الأجسام المضادة نتبع نفس طريقة widal test ويكون كالاتي:

Serum + Bacterial Ag	0.08ml serum + drop of Ag	0.04ml serum + drop of Ag	0.02ml serum + drop of Ag	0.01ml serum + drop of Ag	0.05ml serum + drop of Ag
Titer	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320

Significant titer ≥ 1:320

دليل الاصابة:

تكون جميع انواع البروسيلا متشابهة مستضديا لكونها تحتوي على نوعين من المستضدات هي A ,M ولذلك يمكن استخدام أي من هذه الانواع لغرض التحري عن اضداد الانواع الاخرى ونظرا لسهولة الحصول على *B. abortus* فانه يفضل استعمالها للتحري عن الانواع الاخرى.

اختبار عيارية اضداد الحالة العقدية Antistreptolysin (O) Titer (ASOT)

يفرز هذا الانزيم Streptolysin من قبل بكتيريا المكورات المسبحيات القيحية *Streptococcus pyogenes* على شكل انزيم حال Lysin لخلايا كريات الدم الحمر ويكون هذا الانزيم ذو تركيب بروتيني مستضدي ذات وزن جزيئي ٦٠٠٠٠ دايتون . هذا الانزيم مولد للحمى الرثوية Rheumatic fever يعمل على تحفيز الجهاز المناعي لتكوين الاجسام المضادة ضد ذاك الانزيم ، وكذلك يترسب ففي نسيج القلب في الصمامات القلبية مؤديا الى تلف الصمامات القلبية. تمتاز هذه السموم بانها تالفة لكريات الدم الحمراء بوجود الـ O_2 ومن هنا جاءت التسمية بـ (Streptolysin O) .

تعتبرالاضداد أي الـ Sterptolysin antibodies الاساس في تشخيص الحمى الرثوية و يعتبر العيارية العالية high titer هو مؤشر لحالة الخمج والاصابة بهذا الانزيم الذي يطرح من قبل البكتيريا.

اساس الفحص:

يعتمد مبدا الفحص على تفاعل الـ streptolysin O مع اضداد البكتيريا اذا كانت موودة في مصل دم المريض، وبعدا تضاف كريات الدم الحمر مؤشر على التفاعل و يقاس العيارية على انه معكوس اغلى تخفيف من مصل المريض لا يظهر أي تحلل لكريات الدم الحمراء .

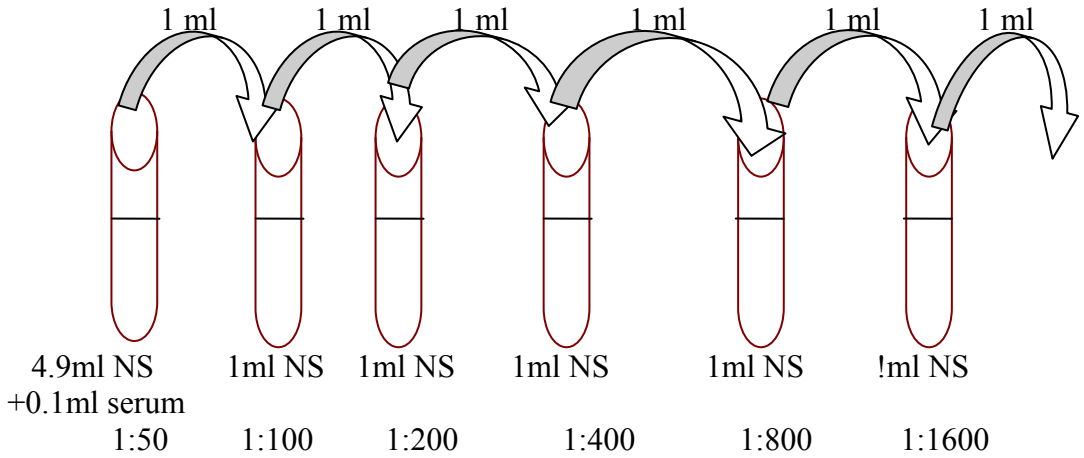
Serum of patient (Ab) + Streptolysin-O (Ag) + RBCs suspension → 1- precipitation of RBCs = positive result (presence of antibodies)

2- Lysis of RBCs = negative result (no antibodies present)

في حالة اذا كانت النتيجة موجبة ، نجري الفحص الكمي وذلك لمعرفة العيارtiter للاجسام المضادة أي نجري عملية تخفيف.

الطريقة القديمة classical method

- يؤخذ 0.1 ml من المصل واضافة 4.9 ml من البفر Buffer الخاصة بـ ASOT للـ Kit او الـ N.S في انبوب صغير وبذلك سوف يكون التخفيف في الانبوب هو 1:50
- تعمل سلسلة من التخافيف Serial dilution من الانبوب الاول وكالاتي:



١- تضاف كمية ثابتة من الـ Ag بمقدار 0.05ml من الـ Streptolysin-O الى كل التخافيف.
٢- يتم اضافة كمية ثابتة من عالق كريات الدم الحمراء RBCs (0.05ml) الى كل التخافيف كمؤشر (indicator)
٣- يثبط مصل المريض حراريا.

٤- توضع جميع الانابيب في حمام مائي بدرجة الحرارة ٣٧م ولمدة ٣٠ دقيقة ومن ثم ملاحظة الراسب للـ RBCs وتحلل هذه الكريات في اخر الانبوب والذي يعتبر معكوس اخر تخفيف.

- ان المعدل الطبيعي للـ ASOT هو ٢٠٠ وباختلاف المصادر.
- تكتب النتائج وكالاتي: ASOT test = - ve

ASOT test = + ve

طريقة اللاتكس (الطريقة الحديثة): Latex method

- وضع قطرة من سيرم المرض مع قطرة من المستضد والذي هو عبارة عن الـ Streptolysin على السلايد .
- في حالة وجود التلازن او التحبب يعني وجود البكتيرية ويجب عمل تخافيف .

يتم اجراء الاختبار و كالاتي:

١- عمل التخافيف كما في الطريقة السابقة.

٢- يتم اضافة قطرة من كل هذه التخافيف الى قطرة من الـ Ag على السلايد وملاحظة التحبب في أي انبوب من هذه الانابيب يختفي ويعتبر في هذه الحالة هو اخر تخفيف.

٣- على سبيل المثال يظهر التحبب في الانبوب ٥ ويختفي في الانبوب ٦ فيكون التخفيف هو ١٦٠٠ وتكتب النتيجة كالاتي:

ASOT test = +ve positive

Titer = 1600 I.U/ml or todd

تسبب هذه البكتيرية *Streptococcus pyogenes* التهاب اللوزتين tonsillitis وبذلك فإنها سوف تسبب التهاب الصمامات القلبية و كذلك تسبب التهاب المفاصل و ذلك لان المعقدات المناعية الناشئة من الطرح، Streptolysin-O سوف تترشح هذه الـ Immunocomplex في المناطق ذات الجريان البطيء في المفاصل والصمامات القلبية مسببة تلفها.

Rheumatoid arithritis

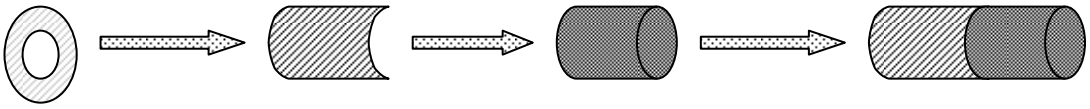
التهاب المفاصل الرثوي (Rheumatic factor)

هو مرض مزمن chronic التهابي inflammatory جهازي systemic شديد sever ويكون راجع recurrent يشمل بشكل اولي المفاصل joints والانسجة المحيطة بالمفصل periarticular tissues حيث يبدء المرض بالمفاصل الصغيرة في اليد والقدم وبعد ذلك يشمل المفاصل المركزية المحورية بالجسم. فيظهر التعب والفتور fever and fatigue وتزداد هذه الاعراض المرضية لتشمل القلب والاوعية الدموية و يصيب المرض النساء اكثر من الرجال وبنسبة ١:٣ وغالبا بعمر ٢٠-٤٠ سنة.

مسبب هذا المرض غير معروف unknown ورغم ذلك هنالك عدة نظريات تفترض ان هناك علاقة ما بين RA وفيروس EBV وكذلك وجد بان ٨٠% من المرضى وجدت مصولهم تحتوي على عامل غير طبيعي يطلق عليه بالعامل الرثوي RF (Rheumatoid fever) وهو من الاضداد الذاتية Autoantibodies التي تسبب autoimmuno diseases و غالبا ما يكون IgM و IgA وكذلك IgG الذي يعتبر نادرا و التي تتولد ضد اضداد IgG المتحورة Denaturated او غير الطبيعية Abnormal والتي تظهر لسبب غير معروف.

سبب ظهور الاعراض المرضية يعود الى العامل الرثوي حيث بالاضداد المتحورة من صنف IgG ومن الموقع المتبلور FC جزيئة الضد وان هذا الارتباط يؤدي الى توليد معقد مناعي immunocomplex يتبعه تنشيط المتم او المكمل complement مما يؤدي الى تجمع الخلايا في منطقة التفاعل مؤدية الى ظهور الحالة الالتهابية وتكون عموما منطقة االتفاعل مؤدية الى ظهور الحالة الالتهابية

وتكون عموما منطقة في منطقة الـ synovium حيث تتجمع الخلايا الالتهابية granulocytes and monocytes مؤدية الى تحويل الوسادة الأسفنجي الموجودة في نهاية العظام حيث تعمل على تأكل نهايات العظام مؤديا الى حدوث الام عند حركة المفصل لعظام كما هو موضح في المخطط التالي:



Synovial B lymphocyte → production of IgG (abnormal IgG) → production of RF type IgM → production of immuno-complex in synovium

↓

Activation of complement **C1**in synovium → intiation and amplification of response → arthritis

Rheumatic factor :- يتم التحري عنه بالكشف عن الاضداد الذاتية التي تظهر في مصول المرضى autoantibodies

اساس الفحص: Principles

يعتمد الفحص على تفاعل γ-globulins البشري المغطى بجزيئات latex مع مصل المريض الحاوي على العامل الرثواني IgM (RF) في المصل بسبب التراص الغير مباشر لجزيئات اللاتكس المحسسة ويفضل ان يكون مصل المريض مخفف ١:٢٠

Serum of patients (1:20) +human γ-globulins →indirect agglutination (positive results)

طريقة العمل:

- تخفيف المصل للمريض الى ١:٢٠.
- نضع قطرة واحدة من مصل control +ve و control – ve وقطرة من مصل المريض المخفف على ٣ دوائر منفصلة على الشريحة .
- رج قنينة المستضد بصورة جيدة ثم اضف قطرة الى كل من القطرات المصلية الثلاث.
- امزج القطرات بواسطة عيدان خشبية منفصلة وافرش كل مزيج على الدوائر المرسومة
- حرك الشريحة الزجاجية لملاحظة التلازن الذي يظهر خلال دقيقتين وحسب ارشادات الـ Kit.
- تعد النتيجة موجبة اذا ما ظهر التلازن خلال دقيقتين اما اذا بقي المحلول متجانسا كنتيجة الـ control ve– فيعتبر خاليا من اضداد الـ RF ويكتب في التقرير على هذه الصورة:

Latex Arithritis test or RF = -ve , Latex Arithritis test or RF = +ve

ان وجود العامل الثواني لا يعني دائما وجود مرض التهاب المفاصل الرثواني حيث ان هذا العامل يظهر في بعض أمراض المناعة الذاتية مثل داء الثعلب الاحمراري Systemic Lupus Erythromatis.