LAB / 86.3

الطرائق المحبذة للإختبارات الأساسية الكيميائية السريرية والدموية في مختبرات مستشفيات المستوى المتوسط

مجموعة عمل لتقييم
التقانات السريرية

منظمة الصحة العالمية
١٩٩٠

LAB/86.3

مجموعة عمل لتقييم التقانات السريرية

الطرائق المحبذة للإختبارات الأساسية الكيميائية السريرية والدموية في مختبرات مستشفيات المستوى المتوسط

WORKING GROUP ON ASSESSMENT OF CLINICAL TECHNOLOGIES

Methods recommended for essential clinical chemical and haematological tests for intermediate hospital laboratories

صدرت الطبعة الأصلية عن
المقر الرئيسي لمنظمة الصحة
العالمية ، جنيف ، ١٩٨٦

وصدرت الطبعة العربية عن
المكتب الاقليمي لشرق البحر
المتوسط ، الاسكندرية ، ١٩٩٠

لا تمثل هذه الوثيقة مطبوعاً رسمياً ، ولا يجوز أن تستعرض أو تلخص أو تقتبس بدون موافقة منظمة الصحة العالمية . والمؤلفون وحدهم هم المسؤولون عن الآراء التي تشملها المقالات المذيلة بتوقيعاتهم .

المُحتوى

صفحة

مقـــدمة ٧

١ - المبادىء العامة ٩

١-١ التدريب والتعليم ٩

١-٢ التجهيزات العامة ٩

١-٣ الكيماويات والكواشف ١١

١-٤ السلامة الحيوية ١٢

١-٥ التعيير ١٢

١-٦ ضمان الجودة ١٣

٢ - فحوص البول ١٤

٢-١ أخذ نماذج البول للاختبارات الكيفية ١٤

٢-٢ ضمان الجودة ١٤

٢-٣ البليروبين . الطريقة : كاشف فوشيه ١٤

٢-٤ الغلوكوز . الطريقة : كاشف بنديكت ١٦

٢-٥ الكثافة الكتلية (الثقل النوعي) . الطريقة : مكثاف البول ١٧

٢-٦ الميتيل كيتون (الأجسام الكيتونية) . الطريقة : اختبار روثيرا ١٩

٢-٧ أنواع الجسيمات . الطريقة : الفحص المجهري للثفالة ٢٠

٢-٨ باهاء pH البول : الطريقة : ورق أو مقياس باهاء ٢٤

٢-٩ اختبار الحمل . الطريقة : اختبار اللاتكس بالشريحة ٢٥

٢-١٠ البروتين : الطريقة : حمض السلفوساليسيليك ٢٦

٢-١١ اختبارات شرائط الغمس : ملاحظات عامة ٢٧

٣ - الاختبارات الدموية ٢٨

٣-١ أخذ نماذج الدم للاختبارات الدموية ٢٨

٣-٢ ضمان الجودة ٣٠

٣-٣ الهيموغلوبين (خضاب الدم) . الطريقة : سيانيدا الهيميغلوبين ٣١

صفحة

٣-٤ أفلام الدم الرقيقة : التحضير والتلوين والفحص ٣٤
٣-٥ (أ) الكسر الحجمي للكريات الحمراء . الطريقة : مكداس الدم ٤٤
٣-٥ (ب) الكسر الحجمي للكريات الحمراء . الطريقة : الطريقة الكبروية ٤٧
٣-٦ التركيز العددي للكريات البيضاء (تعداد الكريات البيضاء) ٤٩
٣-٧ الكسر العددي لأنماط الكريات البيضاء (التعداد التفريقي للكريات البيضاء) ٥٣
٣-٨ التركيز العددي للصفيحات (تعداد الصفيحات) ٥٧
٣-٩ سرعة تثفل الكريات الحمراء . الطريقة : ويسترغرين ٥٩
٣-١٠ اختبار الخلايا المنجلية . الطريقة : الاختزال بالبيتابيسلفيت ٦١
٣-١١ الكسر العددي للكريات الشبكية (تعداد الكريات الشبكية) ٦٣
٣-١٢ (أ) زمن النزف ، طريقة ديوك ٦٥
٣-١٢ (ب) زمن النزف ، طريقة آيفي ٦٧
٣-١٣ أفلام النقي (مخ العظم) ، التلوين والفحص ٦٨
٣-١٤ أفلام النقي ، محتوى الحديد ٦٩
٣-١٥ زمن البروثرمبين . طريقة المرحلة الواحدة ٧١
٣-١٦ زمن الثرمبوبلاستين الجزئي المنشَّط ٧٤

٤ - اختبارات البلازما أو المصل ٧٨

٤-١ أخذ نماذج البلازما أو المصل ٧٨
٤-٢ ضمان الجودة ٧٨
٤-٣ الألبومين . الطريقة : أخضر البروموكريزول ٨٠
٤-٤ الفسفاتاز القلوية . الطريقة : ٤-نتروفينول ٨٦
٤-٥ الأميلاز . الطريقة : النشا - اليود ٩٢
٤-٦ ناقلة الأمين الأسبارتية (أسات) الطريقة : قياس اللون ٩٧
٤-٧ البيكربونات . الطريقة : المعايرة ١٠٣
٤-٨ البليروبين . الطريقة : جندراسيك-غروف ١٠٩
٤-٩ الكلسيوم . الطريقة : كومبلكسون كريزول فثالين ١١٦
٤-١٠ الكرياتينين . الطريقة : تفاعل جافي ١٢٢
٤-١١ قياس غلوكوز البلازما ١٢٧
٤-١١ (أ) الغلوكوز . الطريقة : الطولويدين ١٢٨

صفحة

٤-١١(ب)الغلوكوز . الطريقة : اكسيداز الغلوكوز ١٣٤
٤-١٢ الصوديوم والبوتاسيوم . الطريقة : القياس الطيفي للاصدار اللهبي ١٣٨
٤-١٣ اجمالي البروتين . الطريقة : البيوريت ١٤١
٤-١٤ اليوريا . الطريقة : ثنائي اسيتيل المونوكسيم ١٤٨

٥ - **اختبارات السائل النخاعي** ١٥٣
٥-١ جمع نماذج السائل النخاعي ١٥٣
٥-٢ ضمان الجودة ١٥٣
٥-٣ الغلوكوز . الطريقة : الطولويدين أو اكسيداز الغلوكوز ١٥٣
٥-٣ (أ) قياس غلوكوز السائل النخاعي . الطريقة : الطولويدين ١٥٥
٥-٣ (ب)قياس غلوكوز السائل النخاعي . الطريقة : أكسيداز الغلوكوز ١٥٦
٥-٤ التركيز العددي للكريات البيضاء (تعداد الكريات البيضاء) ١٥٧
٥-٥ اجمالي البروتين . الطريقة : قياس العكر ١٥٨
٦ - ثبت المراجع ١٦٢
٧ - قائمة بالمشتركين ١٦٤

الطرائق المحبّذة للاختبارات الأساسية الكيميائية السريرية والدموية في مختبرات مستشفيات المستوى المتوسط

المقـــــدّمَة

يعطي هذا الكتيب تفاصيل طرائق الاختبارات المقترحة في وثيقة « **تقيم التقانات السريرية ، وتعين الاختبارات الدموية الكيميائية والسريرية في مختبرات مستشفيات المستوى المتوسط** » ، التي أعدّتها مجموعة من الخبراء لصالح وحدة تقانة المختبرات الصحية بمنظمة الصحة العالمية ، جنيف (LAB/86.2) [9] .

وهذا الكتيب موجَّهٌ إلى الكيميائيين الحيويين والصيادلة وتاقني المختبرات أو التقنيين الذين يعملون في الأقسام الكيميائية السريرية أو الدموية أو كليهما في مختبرات مستشفيات المستوى المتوسط .

ويحل هذا الكتيب محل كتيب « الطرائق الروتينية في مختبرات المستوى المتوسط » من تأليف ب.وايلدنغ و ج. كينيدي (LAB/78.1) . وقد أُخذت في الاعتبار ملاحظات مستخدمي هذه الطرائق في البلدان المتقدمة والنامية وآراء مجموعة من الخبراء قامت بمراجعة نقدية للكتيب LAB/78.1 ، عند اختيار الطرائق المحتواة في هذا الكتاب .

وقد تم اختيار الطرائق الموصوفة في هذا الكتيب على أساس المعايير الآتية : خصائص مختلف الطرائق كالمضبوطية accuracy والدقة precision والبساطة simplicity ودرجة تدريب العاملين في مختبر المستوى المتوسط ولاسيما في البلدان النامية ، واعتدال تكلفة الكواشف reagents واستعمال أجهزة بسيطة لا تتطلب صيانة صعبة .

ويضم الكتيب الطرائق الكيفية والكمِّية جميعاً ، ويتبع منهجاً موحداً في وصف كل طريقةٍ ما أمكن ذلك : فيعرض للمبدأ ، والأجهزة والكيماويات chemicals ، وتحضير الكواشف ، وطريقة العمل بما في ذلك التعيير calibration وضبط الجودة quality control ، وكتابة التقرير والقيم المرجعية reference values .

وقد سبق تقيم الاختبارات الدموية من أجل مطبوعات أخرى لمنظمة الصحة العالمية . أما الاختبارات الكيميائية السريرية فتقوم على إجراءات وطيدة ثبتت قيمتها العملية في دراسات مخبرية .

وقد صممّ هذا الكتيب ليكون تمريناً حركياً ، مع دعوة الممارسين لإرسال ملاحظاتهم ، بغية تحديد الطرائق التي يمكن تبنّيها في المستقبل ربّما لتحل محل بعض طرائق هذا الكتيب في طبعات قادمة .

وفي الفصل السادس ثبت بالمراجع يضم الكتب والوثائق التي استخدمت في إعداد هذا الكتيب . أما المراجع المتعلقة بكل طريقة فمذكورة في صلب النص .

١ – المبادىء العامة

١–١ التدريب والتعليم

المؤهلات اللازمة لأداء العمليات الموصوفة في هذه الوثيقة هي :

– التعليم الأساسي : ١٠ – ١٢ سنة

– تدريب تِقْنيّ لتخريج تقني مخبري متعدد التكافؤ ، بحيث يضم هذا التدريب :

– دراسة الطرائق وضبط الجودة في الكيمياء السريرية clinical chemistry و الدمويات haematology .

– أساسيات الإدارة : حفظ النتائج ، والسجلات ، وإعداد التقارير الشهرية والسنوية ، وتقدير الكيماويات والكواشف والتوريدات الأخرى اللازمة ، وتخزين الكواشف ، إلخ . والإشراف على المختبرات المحيطية .

– الصيانة الوقائية وأعمال الاصلاح الأولية للاحتفاظ بالأدوات في حالة جيدة .

– السلامة الحيوية في المختبر .

كما يجب الاهتمام بالخصائص الشخصية التالية : النزاهة ، والمبادأة ، والحماسة ، والمسؤولية .

وينبغي أن يعمل التقنيون تحت إشراف محلي مستمر مع إجراء تقييم تقني دوري .

ويجب أن يتم التدريب في مؤسسات عامة أو خاصة أو في الجامعة .

وتوجد معلومات اضافية عن التدريب في وثيقة أصدرها الاتحاد الدولي للكيمياء السريرية IFCC [3] .

١–٢ التجهيزات العامة

سبق لمنظمة الصحة العالمية أن أصدرت وصفاً مفصلاً للتجهيزات المطلوبة [14] .

الميزان balance

نصف تحليلي ، تحميل علوي ، إلكتروني ، معاوضة القوة المغناطيسية ، قراءة رقمية . يمكن تشغيله من بطارية ١٢ فولط أو تيار كهربائي ٢٢٠ فولط ٥٠ هرتز ، أو ١١٠ فولط ٦٠ هرتز . مجال الوزن حتى ١٠٠ غ . الحساسية ١ مغ . كفة من الفولاذ الصامد يمكن تحريكها ، وجسم مقاوم للائتكال ، ومزوَّد بوسيلة لجعله في مستوى أفقي . ويجب اتخاذ كل وسيلة ممكنة لحماية الأجزاء المتحركة والكهربائية من الغبار والرطوبة .

ودرجة الحساسية الآنفة الذكر ضرورية بشكل خاص لعمل المحاليل المعيارية اللازمة في إجراء المقايسات الكيميائية السريرية . وقد كانت تستعمل في الماضي الموازين الميكانيكية ولكن تشغيلها قد أظهر أنها غير مقبولة على الاطلاق ، فسرعان ما يتدهور مردود الميزان إذا لم يتم إجراء الصيانة الحاذقة المنتظمة .

المِنبذة Centrifuge – المتعددة الأغراض

كهربائية ، ٢٢٠ فولط ٥٠ هرتز أو ١١٠ فولط ٦٠ هرتز . ذات رأس متأرجح فيه أربعة أو ستة أماكن أو أكثر ، لأنابيب سعتها ١٥ مل ، سرعة يمكن ضبطها ويمكن أن تصل إلى ٣٠٠٠ دورة في الدقيقة . قاعدة معدنية ثقيلة وسلطانية واقية . غطاء مُتَمَفْصِل يُفضَّل أن يكون به جهاز إقفال لمنع انفتاح الغطاء أثناء دوران المنبذة .

المجهر microscope

ذو عينيَّتين ، وأنبوب مستقيم ذو أنفيَّة دوارة بها ثلاث فتحات ومُوقفات راسخة لجعلها على استقامة الأنبوب . قاعدة يجب أن تكون صلبة ، وأن توفر منصة ثابتة ، وأن تكون مقاومة للانتكال . لولب ضابط للبؤرة دقيق وآخر غليظ ، رفٌّ ميكانيكي يوفر حركة طولية وعرضية . (x-y)

الأجزاء البصرية : عدسة عينية Occular X10 (تكبير ١٠ مرات) . عدسات شيئية لا لونية : ١٠ و ٤٠ و X١٠٠ (مزودة برفّاس) . مُكثِّفة آبيّ Abbe بسيطة ذات حجاب وحامل للمرشح . مرآة مستوية – مقعرة .

الإضافات : مرشح أزرق ، مرشح متعادل الكثافة ، علبة للنقل . غطاء قماشي للخزن في المناخاتِ الرطبة ، وغطاء بلاستيكي صلب ذو قاعدة ، مصمم لمنع الغبار بأقصى ما يمكن في المناخات الحارة الجافة .

مصدر ضوء صنعي على الوجه الآتي : كهربائي بمصباح ١٢ فولط ٣٠ واط ، يشغَّل إما من خلال مقاومة متغيرة من مصدر تيار مستمر DC ١٢ فولط ، أو من خلال محوِّل متغير من مصدر تيار متناوب AC ١١٠/١١٥ فولط أو ٢٢٠/٢٤٠ فولط .

الثلاجة (البراد)

- السعة الداخلية الإجمالية حوالي ٤٦ لتراً
- السعة التخزينية الصافية ٢٨ لتراً
- الحجيرة الجمّادة : ٣–٥ لتر

- مصدر كهربائي ٢٢٠ فولط ٥٠ هرتز أو ١١٠ فولط ٦٠ هرتز ، أو غاز أو كيروسين (كاز) .
- مادة السطح الخارجي : من البلاستيك أو الفولاذ .
- مادة البطانة الداخلية : من البلاستيك أو الفولاذ .

وقد ابتكرت وحدة « سلسلة التبريد » بمنظمة الصحة العالمية ثلاجة (صندوق تبريد عالي المردود مزود بوحدة مكثف ثلاجة جانبية) لحفظ اللقاحات بعد تجارب مستفيضة . وهي تعمل في درجة من حرارة المحيط تصل إلى ٤٣° س ، وتحتفظ بدرجة حرارة ٤° س لفترات طويلة بفضل أكياس من الجليد بداخلها في حالة انقطاع التيار . وعلى الرغم من أنها أغلى من ثلاجة بنفس الحجم من النوع التبخيري المنزلي الشائع ، فإنها محبّذة جداً لمتانتها وحُسْن درجة العزل فيها ، والتصميم الخاص لوحدتها التبخيرية الذي يمكّنها من العمل في درجات عالية من حرارة المحيط .

الحمام المائي Water bath

مكوَّن من حوض سعته حوالي ٢٠ لتراً ، يُشترى تجارياً أو يصنع محلياً من الفولاذ المقاوم للصدأ stainless steel أو أية مادة غير حديدية أخرى يمكن تنظيفها بسهولة . مثبت فيه ضابط للحرارة . مجال درجات الحرارة من ٥° س فوق درجة المحيط حتى ١٠٠° س . تموج درجة الحرارة : ± ٠,٥° س .

ويفضل للدرجة ١٠٠° س استعمال وعاء أصغر بمصدر للتسخين ملائم أو سخّانة للغلي .

المقياس الطيفي Spectrometer (**المقياس الضوئي الطيفي ، المقياس اللوني**)

مع أنه يوصى باستعمال المقياس الطيفي (الذي كان يدعى المقياس الضوئي الطيفي Spectrophotometer) ، فإننا نعرف أن بعض المختبرات لا تزال تستعمل المقياس اللوني Colorimeter (التسمية الجديدة : المقياس الطيفي المرشحي filter spectrometer) . ولهذا السبب يُذكَر طول الموجة ومواصفات المرشح . وتُعطىٰ مرشحات إيلفورد Ilford كمراجع ولكن يمكن استعمال مراشح مماثلة أخرى .

١-٣ الكيماويات والكواشف

يجب أن تكون الكيماويات chemicals نقية ، مثلاً : من الدرجة المخبرية laboratory grade ، مالم يُحدَّد غير ذلك . وقد أجريت جميع الحسابات بغرض وجود مادة نقية لا مائية ، مالم يكن ماء الإماهة hydration لازماً . ويجب أن تكون الكيماويات لتحضير المعايير أنقى المتيسر منها .

ويلزم استعمال الماء المقطر لتحضير الكواشف reagents .

ثبات الكواشف : الكواشف ذات الثبات المذكور أنه في درجة الحرارة ٢–٨° س ، يجب خزنها في الثلاجة (البراد) ، ويجب عدم الاحتفاظ بها فترات طويلة في درجة حرارة الغرفة . والكواشف التي يذكر أن ثباتها في درجة الحرارة ٢٠–٢٥° س إذا حفظت في درجة حرارة الغرفة العادية في المناخات الحارة ، فإن الثبات المذكور مجرّد مرشد للاستئناس ، ويجب أن يتحقق مستعملوها من ثباتها بأنفسهم .

١–٤ السلامة الحيوية

توجد تفاصيل كاملة عن السلامة الحيوية **biosafety** في المختبر في كتيب أصدرته منظمة الصحة العالمية [6] .

ويجب التوكيد بصفة خاصة على النواحي الآتية :

- يوجد خطر كامن في جميع المواد الكيميائية ، ويجب تداولها بعناية بالغة حسب توصيات الصانعين . ويجب توخّي الحرص الشديد عند استعمال الحموض acids والقواعد bases . وعند تخفيف الحموض يجب دائماً إضافة الحمض إلى الماء ببطء . ويجب أن لا يضاف الماء إلى الحمض المركّز . وعند تحضير محلول هدروكسيد الصوديوم ، يجب إذابة الأقراص pellets بكميات صغيرة لتجنب انتاج حرارة زائدة . ويترك المحلول ليبرد قبل تخفيفه إلى الحجم المطلوب .
- يجب تجنب استخدام الفم للتوزيع بالممص واستعمال بصلة مطاطية لتحاشي مخاطر المحاليل الأكّالة وخطر التعرض للخمج (العدوى) من العينات البيولوجية .
- كل نموذج من مريض يحتمل أن يكون معدياً ولهذا يجب بذل عناية بالغة بالنسبة إلى جميع النماذج . ويجب تجنّب الجمائع pools المصلية من نماذج المرضى ما أمكن للتخفيف قدر المستطاع من خطر التعرض لالتهاب الكبد **hepatitis** والأيدز **AIDS** الخ .

١–٥ التعيير

يقدم النص تفاصيل كاملة عن التعيير **calibration** لكل طريقة بمفردها .

وعند اعتماد طريقة في مختبر ، يجب عمل رسم بياني للتعيير الكامل للتثبت من أن الطريقة ناجعة في المجال التحليلي المطلوب . وبعد ذلك يجب عمل رسم بياني للتعيير الكامل كلمّا تمّ تحضير كواشف جديدة ، وكلّما أجريت تغييرات في أي جزء من الأجهزة ، ومرةً كل شهر على الأقل للتحقق من النظام التحليلي .

وعندما يجرى التعبير الكامل ويُعرف بأن الطريقة خطِّية linear ، يمكن بعدئذ استعمال معيار واحد لحساب التركيز في عينات المرضى والشواهد controls .

١-٦ ضمان الجودة

يتضمن ضمان الجودة جميع الإجراءات التي يمكن أن يتخذها المختبر لضمان كفاءته وفعاليته أيضاً في تقديم أقصى نفع ممكن للأفراد وللمجتمع ، وكذلك لتحقيق أداء مخبري بأدنى خطر ممكن على العاملين فيه .

ويضم ضمان الجودة وبمعناه الواسع الممارسة المخبرية الجيدة ، وجميع الخطوات السابقة للتحليل من أمثال جمع النماذج وتداولها ، والتحليل نفسه ، واستعمال طرائق وكواشف جيدة ومستحضرات مرجعية ، وصيانة الأجهزة صيانة صحيحة ، كما يضم نظاماً مصمماً لضمان معولية reliability النتائج مثل الإجراءات الداخلية لضبط الجودة المعدّة بصورة أساسية لضبط الدقة precision ، ومثل برامج تقييم الجودة للتحقق من المضبوطية accuracy . والسلامة الحيوية biosafety أيضاً جزء من برامج ضمان الجودة [17,6] .

٢ – فحوص البول

٢–١ أخذ نماذج البول للاختبارات الكيفية

يجب أخذ نماذج البول في أوانٍ نظيفة زجاجية أو بلاستيكية ، وتغطيتها فوراً . ويجب شطف الوعاء بماء الشرب الرائق قبل جمع البول ، فالمنظفات والصابون تؤدي إلى نتائج كاذبة . وعلى المريضات أن يغسلن منطقة الشفرين والفرج قبل جمع البول .

ومن الأفضل أخذ أول نموذج للبول في الصباح عندما يكون في أعلى تركيز . ويجب جمع نحو ٥٠ مل من البول ، والطلب إلى المريض أن يطرح الجزء الأول من البول وأن يأخذ النموذج من وسط الجريان . ويجب إرسال البول إلى المختبر واجراء الاختبارات دون تأخير . وإذا كان لابدّ من التأخير ، فيجب حفظ البول في ثلاجة (برّاد) ولكن ليس أكثر من ٢٤ ساعة . ويجب تمييز وعاء البول بوضع لصاقة عليه تحتوي على تفاصيل هوية المريض (الاسم ، الرقم ، الخ) وتاريخ ووقت أخذ النموذج .

ويجب تداول نماذج البول بحذر ، إذ يحتمل أن تكون ممرضة pathogenic .

٢–٢ ضمان الجودة

على الرغم من أن نموذج التعيير لا يلزم للفحوص الكيفية للبول ، فإنه يوصى باستعمال شواهد controls إيجابية وأخرى سلبية . ويتم تحضير الشاهد الإيجابي باضافة بعض الغلوكوز أو بروتين المصل أو الأسيتون إلى ماء مقطر . وللباهاء pH (الرقم الهدرجيني) يمكن استعمال محاليل دارئة buffer معيارية للتحقق من ورق الباهاء pH . ولاختبار الحمل ، يمكن استعمال بول امرأة حامل . وللبليروبين يمكن استعمال مصل يرقاني icteric serum مخفف بالماء ، ولكن **لا يجوز** استعمال مصل من مريض بالتهاب الكبد . وللكثافة الكتلية mass density ، يجب أن يعطي الماء المقطر قراءة ١٠٠٠ .

٢–٣ **البليروبين . الطريقة : كاشف فوشيه** Fouchet's reagent

٢–٣–١ المبدأ

عندما يضاف كلوريد الحديد (٣) في محلول حمضي إلى رُسابة precipitate من بول يحتوي على البليروبين ، يَنتُج لون أخضر .

٢–٣–٢ الأجهزة والكيماويات

– دورق beaker (سعة ١٠٠ مل)

- ممصات pipettes مدرّجة (٥ مل بتدريجات ٠,١ مل
- ممصة قطّارة dropping pipette
- ورق ترشيح ، كيفي qualitative
- أنابيب اختبار (١٣×١٠٠ مم)
- حوجلة حجمية volumetric flask (سعة ١٠٠ مل)
- قمع ، بلاستيكي أو زجاجي (بقطر ١٠٠ مم)
- كلوريد الباريوم ، ثنائي الهيدرات barium chloride
- كلوريد الحديد (٣) iron (III) chloride
- حمض ثلاثي كلور الاسيتيك trichloracetic (تحذير : تداوله بعناية ؛ أكال قوي)

٢-٣-٣ الكواشف

١ - **كلوريد الحديد (٣) ١٠٠ غ/(١٠ ٪ وزن/حجم)** . زِنْ ١٠ غ من كلوريد الحديد (٣) ، وضَعْها في حوجلة حجمية سعتها ١٠٠ مل ، وأكمِلْ بالماء المقطر إلى ١٠٠ مل . يجب حفظ هذا المحلول في قارورة قاتمة اللون ، وهو ثابت مدة شهر في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢ - **كلوريد الباريوم ٠,٤٨ مول/ل** . زِنْ ١٢ غ من ثنائي الهدرات كلوريد الباريوم ، وضَعْها في حوجلة حجمية سعتها ١٠٠ مل ، وأكمِلْ بالماء المقطر الى ١٠٠ مل . هذا المحلول ثابت عدة أشهر في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٣ - **كاشف فوشيه** . زِنْ بسرعة ٢٥ غ من حمض ثلاثي كلور الأسيتيك في دورق سعته ١٠٠ مل ، وأضِفْ ٥٠ مل من الماء المقطر لإذابة حمض ثلاثي كلور الأسيتيك . انقل المحلول إلى حوجلة حجمية سعتها ١٠٠ مل باستعمال قمع . أضِفْ ١٠ مل من محلول كلوريد الحديد (٣) ، وامزج وأكمِلْ بالماء المقطر الى ١٠٠ مل . هذا المحلول ثابت عدة أشهر في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢-٣-٤ طريقة العمل

١ - ضع ٥ مل من البول في أنبوب اختبار .

٢ - أضِفْ ٢ مل من محلول كلوريد الباريوم ، ستتكون رُسابة .

٣ - رشِّح المزيج في أنبوب اختبار آخر ، تبقى على ورقة الترشيح الرسابة التي تحتوي على البليروبين إذا كان موجوداً في البول .

٤ - افرد ورقة الترشيح وجفِّفها بوضعها على ورقة ترشيح ثانية جافة .

٥ - أضِفْ قطرةً من كاشف فوشيه إلى الرسابة على ورقة الترشيح .

٢-٣-٥ التقـــرير

سلبي – لا تغير في اللون
ايجابي – تصبح الرسابة خضراء

٢-٤ الغلوكوز : الطريقة : كاشف بنديكت Benedict's reagent

٢-٤-١ المبـدأ

عندما تسخن سلفات النحاس (٢) القلوية في وجود الغلوكوز أو مواد مختزلة (مرجعة) reducing أخرى ، فانها تُختزل إلى أكسيد النحاس (١) ، ويمكن تقدير كمية الغلوكوز الموجود بتشكّل رسابة صفراء مخضرّة إلى حمراء .

٢-٤-٢ الأجهزة والكيماويات

- دَوْرقان (سعة ٥٠٠ مل ، ٢٥٠ مل)
- ممصات مدرجة (١ مل و ٥ مل بتدريجات .. مل)
- أنابيب اختبار (١٥٠ × ١٦ مم)
- حوجلة حجمية (٥٠٠ مل)
- حمام مائي ، ١٠٠°س
- سلفات النحاس ، خماسية الهدرات copper sulfate
- كربونات الصوديوم ، اللامائية sodium carbonate
- سترات ثلاثية الصوديوم ، ثنائية الهدرات tri-sodium citrate

٢-٤-٣ الكواشــف

١ - **كاشف بنديكت الكيفي** . زِنْ ٨,٦ غ من كبريتات النحاس ودوبّها في ٧٥ مل من الماء المقطر في دورق صغير . زِنْ ٥٠ غ من كربونات الصوديوم و ٨٦,٤ غ من السترات ثلاثية الصوديوم وضعهما في دورق سعته ٥٠٠ مل . أضِفْ ٢٥٠ مل من الماء المقطر وسخّن بلطف لتذوب المواد الكيميائية . دعها تبرد . أضِفْ اليها محلول كبريتات النحاس . اشطف الدورق الصغير في ماء مقطر وأضِفْه ثم أكمِلْ إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر في حوجلة حجمية . هذا الكاشف ثابت ثلاثة أشهر على الأقل في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢-٤-٤ طريقة العمـل

١ - أضِف ٠,٤ مل من البول الى ٥,٠ مل من كاشف بنديكت الكيفي في أنبوب اختبار وامزجهما .

٢ - ضع الأنبوب في حمام مائي يغلي مدة ٥ دقائق .
٣ - أخرِجْ الأنبوب من الحمام ودعه يبرد ببطء .

٢-٤-٥ التقرير

افحص المحلول في الأنبوب لتحرّي وجود رسابة وتغيير في اللون ، واكتب تقريرك على النحو التالي :

سلبي	=	أزرق (رائق أو غائم)
أثر زهيد	=	أخضر دون راسب
+	=	أخضر مع راسب (حوالي ٥ غ/ل)
++	=	بني (حوالي ١٠ غ/ل)
+++	=	برتقالي (حوالي ١٥ غ/ل)
++++	=	أحمر (حوالي ٢٠ غ أو أكثر/ل)

ملاحظات : البول السوي لا يحتوي على غلوكوز glucose . وأكثر المواد المختزلة شيوعاً في البول هي الغلوكوز ، ولكن سكاكر أخرى قد توجد أحياناً في البول تختزل كاشف بنديكت أيضاً . وقد يوجد اللاكتوز lactose في بول النساء الحوامل أو المرضعات ، والغالاكتوز galactose والفركتوز fructose في أمراض وراثية . وبالاضافة إلى هذه السكاكر ، قد توجد مواد أخرى أحياناً في البول بتركيز يكفي لاختزال كاشف بنديكت ، ومن هذه المواد حمض الأسكوربيك ، والكرياتينين ، واليورات ، وبعض الأدوية كالساليسيلات والبنسلين والستربتوميسين والأيزونيازيد وحمض البارا-أمينو ساليسيليك ، إلخ .

٢-٥ **الكثافة الكتلية** mass density (**الثقل النوعي**) . **الطريقة** : **مكثاف البول** urinometer

٢-٥-١ المبدأ

الكثافة الكتلية النسبية ، وتسمى أيضاً الثقل النوعي specific gravity ، لأي سائل هو كثافته بالمقارنة مع كثافة الماء المقطر ، التي اصطلح على جعلها ١٠٠٠ . فالكثافة الكتلية تابع (دالة) لعدد وكثافة ووزن الجزيئات المذابة الموجودة ، وتُستعمل كقياس لقدرة الكلية على التركيز .

٢-٥-٢ الأجهزة

- مخبار (٥٠ مل)
- مقياس حرارة (صفر - ٥٠°س)
- مكثاف البول

٢-٥-٣ طريقة العمل

١ – اسكب حوالي ٤٠ مل من البول في المخبار .
٢ – أنزل مكثاف البول بلطف في البول ، وحرّكه حركة دورانية ثم اتركه (تجنّب تكوين رغوة) .
٣ – انتظر حتى يستقر مكثاف البول . يجب أن لا يكون على تماس مع جوانب المخبار أو قاعه .
٤ – اقرأ الكثافة الكتلية المعطاة على المكثاف عند سطح البول (أدنى نقطة في الهلالة meniscus) .
٥ – أخرِجْ مكثاف البول وقِسْ درجة حرارة البول .

٢-٥-٤ الحســابات

١ – تحقَّق من درجة الحرارة التي تمّ تعيير مكثاف البول عندها (تكون مبيّنة على الجهاز من قبل الصانعين) . وهي عادة ٢٠°س .
٢ – أضِفْ لكل ٣°س من درجة حرارة البول فوق درجة حرارة التعيير ، مقدار ٠,٠٠١ الى الكثافة الكتلية المقيسة . واطرح لكل ٣°س من درجة حرارة البول تحت درجة حرارة التعيير ، مقدار ٠,٠٠١ من الكثافة الكتلية المقيسة .

مثـال

– مكثاف البول تم تعييره في الدرجة ٢٠°س
– درجة حرارة البول ٢٦°س
– الكثافة الكتلية المقيسة ١,٠٢١
– درجة حرارة البول أعلى من درجة حرارة التعيير بمقدار ٦°س ولهذا يضاف إلى الكثافة الكتلية المقيسة :

$$\frac{٦}{٣} \times ٠,٠٠١ = ٢ \times ٠,٠٠١ = ٠,٠٠٢$$

فتكون الكثافة الكتلية الحقيقية للبول هي ، إذن :

$$١,٠٢١ + ٠,٠٠٢ = ١,٠٢٣$$

٢-٥-٥ التقـرير

الكثافة الكتلية (الثقل النوعي) يعبّر عنها التقرير برقم الكثافة الكتلية المقيسة .
مجال السواء : ١,٠١٠ – ١,٠٣٠

٢-٦ الميثيل كيتون (الأجسام الكيتونية) . الطريقة : اختبار روثيرا Rothera's test

٢-٦-١ المبـدأ

عندما يضاف صوديوم-٢-نتروزيل بنتاسيانوفيرات (٣) (المسمى أيضاً نتروبروسيد الصوديوم) الى البول المحتوي على الميثيل كيتون methylketone ، يتشكّل لون بنفسجي .

٢-٦-٢ الأجهزة والكيماويات

- ممصات مدرّجة (سعة ١ مل و ٥ مل و ١٠ مل بتدريجات ٠,١ مل)
- أنابيب اختبار (١٥٠ × ١٦ مم)
- هيدروكسيد الأمونيوم ammonium hydroxide ، مركزّ (محلول الأمونيا ٢٥ ٪ وزن/حجم)
- حمض الاسيتيك ، الجليدي
- صوديوم-٢-نتروزيل بنتاسيانوفيرات (٣) ثنائية الهدرات Sodium-2-nitrosyl penta-cyanoferrate (III)

٢-٦-٣ الكواشـف

محلول صوديوم-٢-نتروزيل بنتاسيانوفيرات . قبل إجراء الاختبار مباشرة ، ضَعْ بلّورات قليلة من المادة الكيميائية في أنبوب الاختبار (ما يكفي لتغطية القاع) . أضِفْ ٥ مل من الماء المقطّر ورُجّ حتى تذوب غالبية البلورات (لا يُتوقع أن تذوب كل البلورات لأن المحلول مُشبَع) .

٢-٦-٤ طريقة العمل

١ - ضع ١٠ مل من البول في أنبوب اختبار .
٢ - أضِفْ ٠,٥ مل من حمض الأسيتيك الجَمُود (الثلجي) إلى البول
٣ - أضِفْ ٠,٥ مل من محلول النتروبروسيد المحضر إلى المزيج وأمزج جيداً .
٤ - أمسك ممصاً بحيث تستند نهايته على جدار أنبوب الاختبار ، ودَعْ ٢٠ قطرة (= ١ مل) من محلول الأمونيا تنساب على الجدار إلى سطح السائل .
٥ - انتظر ٥ دقائق ثم اقرأ النتائج .

٢-٦-٥ التقـرير

سلبي	=	لا تغيير في اللون
+	=	حلقة قرنفلية
++	=	حلقة حمراء
+++	=	حلقة بنفسجية قاتمة

ملاحظات : ١ – البول السوي خال من الميثيل كيتون .

٢ – قد يحدث تفاعل ضعيف كاذب إذا كان البول يحتوي على ل–دوبا L-Dopa (دواء يستعمل في علاج داء باركنسون) أو على كميات كبيرة من حمض الفنيل بيروفيك (الذي يوجد في الاضطراب النادر بيلة الفنيل كيتون phenylketonuria) .

٢–٧ أنواع الجُسَيْمات . الطريقة : الفحص المجهري للثفالة sediment microscopy

٢–٧–١ المبــدأ

يحتوي البول على عناصر مجهرية معلّقة (خلايا ، بلورات ، إلخ) . وهذه العناصر تُجمّع بالتنبيذ ، وتُفحص قطرة من الثفالة تحت المجهر بين شريحة وساترة . ولأن جميع هذه العناصر المعلّقة تتثفّل لو بقي البول ساكناً بضع ساعات ، فإنها تسمى رواسب بولية . ولكن يجب أن لا يسمح لنموذج البول بالبقاء ساكناً لأن طبيعة الثفالة تتغير بمرور الوقت .

٢–٧–٢ الأجهزة والكيماويات

- منبذة centrifuge ، متعددة الأغراض
- أنابيب تنبيذ (سعة ١٥ مل)
- مخبار قياس (٥٠٠ مل)
- مجهــر
- ممصات باستور
- شريحة وساترة (٢٠ × ٢٠ مم)

٢–٧–٣ طريقة العمل

١ – حرّك نموذج البول بلطف لكي تحصل على معلّق متماثل .

٢ – اسكب ١٠–١٢ مل من البول على الفور في أنبوب منبذة .

٣ – نبّذ الأنبوب بسرعة متوسطة (١٠٠٠–١٥٠٠ دورة في الدقيقة) مدة خمس دقائق .

٤ – اطرح البول الطافي بقلب الأنبوب بسرعة دون رجّ . تبقى الثفالة في قاع أنبوب التنبيذ .

٥ – رُجّ الأنبوب برفق بالنقر على قاعه لتعيد تعليق الثفالة مع البول الثمالي residual urine الذي يسيل نازلاً على جانب الأنبوب .

٦ – اسحب قطرات قليلة من الثفالة إلى داخل ممص باستور . ضَعْ قطرة على شريحة وغطّها بساترة مع الحرص على عدم تشكل فقاعات .

ملاحظـة : قد تؤدي عدم كفاية المعلق الى تغايرات كبيرة في النتائج .

٧ - افحص الشريحة تحت المجهر فوراً باستعمال الشيئية ١٠X أولاً على ضوء خافت (وذلك بخفض المكثّفة أو بغلق الحجاب أو بالأمرين معاً) . تفرَّس scan الساحة المجهرية بهذه الطريقة ثم استعرِفْ الجسيمات المرئية كلاً على حدة باستعمال الشيئية ٤٠X .

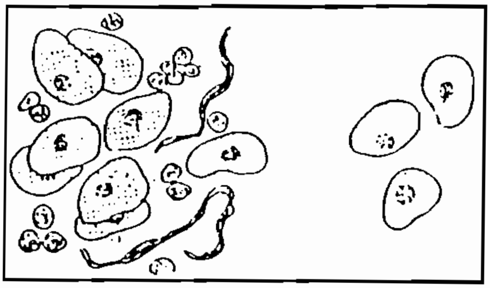
ملاحظة : إن المبالغة في الإضاءة تسبب عدم رؤية الأشياء الشفافة من أمثال الاسطوانات الشفافة hyaline casts . ويجب استعمال التكبير ٤٠X للاستعراف فقط وليس للتفرّس ، لأن الساحة تكون بالغة الصغر وربمّا تفوت المرء رؤية الأشياء الأكثر ندرة .

ويمكن أن توجد العناصر التالية في رواسب البول :

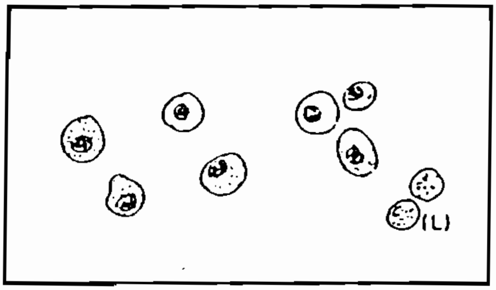
كريات حمراء	المشعَّرة trichomones	الاسطوانات casts
كريات بيضاء	نطاف	بيوض ويرقات طفيلية
خمائر وجراثيم	خلايا ظهارية epithelial cells	بلورات crystals

سوف تساعدك التوضيحات الواردة في الصفحات ٢١ - ٢٣ في تعيين بعض هذه العناصر .

أمثلة للخلايا

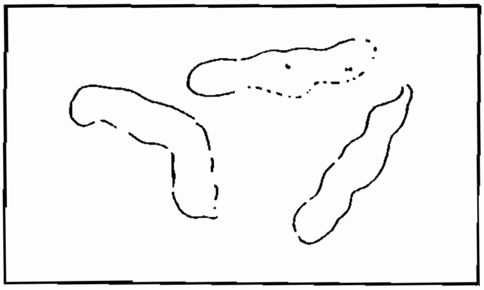


خلايا من نُبيبات الكلية والمثانة والإحليل

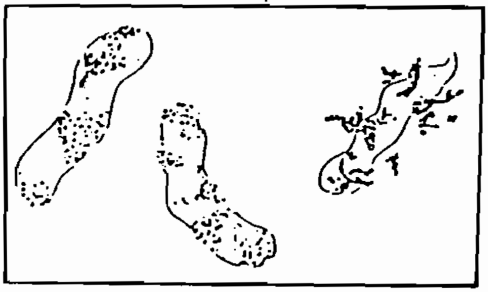


خلايا كلوية (صغيرة : بحجم كرية أو كريتين بيضاوين) محببة جداً

أمثـلة للاسـطوانات



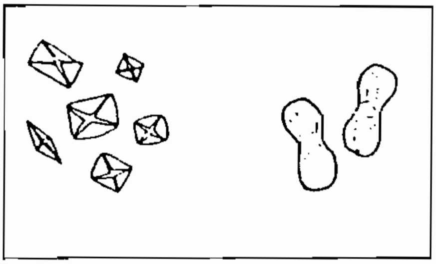
اسطوانات شفافة :
شفافة كاسرة قليلاً للضوء
النهايات مستديرة أو مستدقة
(وقد توجد في الأصحاء بعد مجهود عضلي شاق) .



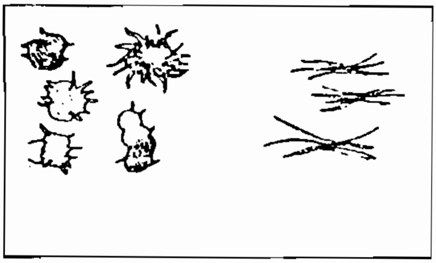
اسطوانات حبيبة دقيقة
تكون الحبيبات أصغر ولا تملأ الاسطوانة

أسطوانات حبيبة خشنة
اسطوانات قصيرة بعض الشيء مملوءة بحبيبات كبيرة ، ذات لون أصفر باهت ، بنهايات مستديرة (تنشأ الحبيبات من خلايا ظهارية متنكّسة من نُبَيْبات الكلية) .

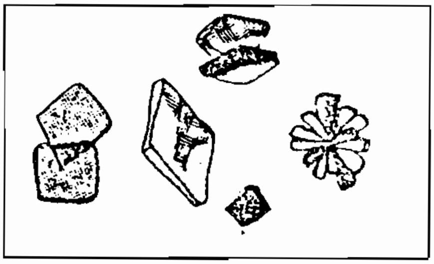
بعض البـلورات



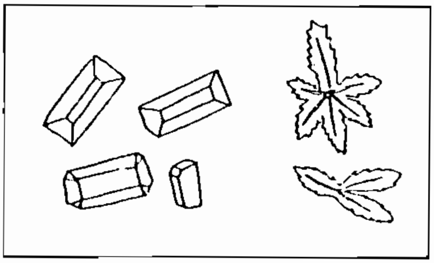
أكسالات الكالسيوم
(بول حمضي)



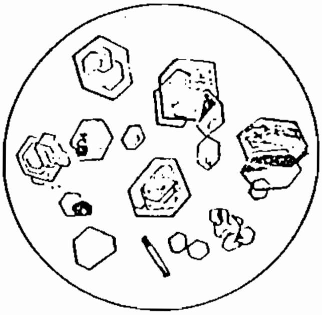
يورات الأمونيوم
(بول قلوي)



حمض اليوريك
(بول حمضي)

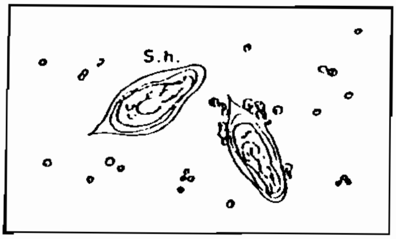


فسفات « ثلاثية »
(بول قلوي)



بلورات سيستينية

بعض بيوض الطفيليات



بيوض البلهارسية الدموية Schistosoma haematobium
(مع كريات حمراء)

٢-٧-٤ التقـرير

من المهم ذكر مقدار العناصر المختلفة الموجودة في كل ساحة (الشيئية X ٤٠) ، والمثابرة على استعمال نفس الطريقة للتعبير عن المقادير دائماً . فمثلاً يمكن كتابة التقرير عن الكريات الحمراء والكريات البيضاء على النحو التالي :

الكـريات الحمــراء

صفر-١٠ كريات حمراء/ساحة	تكتب في التقرير :	بضع كريات حمراء (صفر-١٠/ساحة)
١٠-٣٠ كرية حمراء/ساجة	تكتب في التقرير :	عدد متوسط من الكريات الحمراء (١٠-٣٠/ساحة)
أكثر من ٣٠ كرية حمراء/ساحة	تكتب في التقرير :	كريات حمراء كثيرة (أكثر من ٣٠/ ساحة)

الكريات البيضـاء

صفر-١٠ كريات بيضاء/كل ساحة	تكتب في التقرير :	كريات بيضاء قليلة (صفر-١٠/ كل ساحة)
١٠-٢٠ كريات بيضاء/كل ساحة	تكتب في التقرير :	عدد متوسط من الكريات البيضاء (١٠-٢٠/كل ساحة)
٢٠-٣٠ كريات بيضاء/كل ساحة	تكتب في التقرير :	كريات بيضاء كثيرة (٢٠ - ٣٠/كل ساحة)
لزنات clumps من أكثر من ٢٠ كرية بيضاء متكسة	تكتب في التقرير :	كريات بيضاء كثيرة في لزنات

٢-٨ باهاء pH البول . الطريقة : ورق أو مقياس باهاء

٢-٨-١ المبــدأ

في بعض المواقف السريرية المعيّنة ، قد يكون مفيداً قياس باهاء البوَل بأوراق مشعر أو بمقياس باهاء .

٢-٨-٢ الأجهزة والكيمياويات

- ورقة مشعر بالباهاء ، المجال ١ - ١٠
- مقياس باهاء
- دوارىء معيارية لمقياس الباهاء

٢-٨-٣ طريقة العمل

توضع قطرة من البول على قطعة من ورقة مشعر ، ويقارن اللون الناتج بألوان خريطة معيارية . ويمكن أيضاً استخدام مقياس باهاء ، ولكن يجب دائماً معاورته بدوارىء معيارية قبل استعماله .

٢-٨-٤ التقــرير

باهاء سوية – حوالي ٦,٠ (حد المجال السوي : ٥,٠ الى ٧,٠)
باهاء حمضية – ٤,٥ الى ٥,٥ (الداء السكري ، التعب العضلي ، الحماض)
باهاء قلوية – ٧,٥ الى ٨,٠ (خمج السبيل البولي ، القوت النباتي)
تكتب في التقرير – الباهاء – قيمة عددية ، مثال : الباهاء ٦,٠

يكون تحديد باهاء البول مفيداً أيضاً في التعيين المجهري اللاحق للرواسب البلورية . فبعض البلورات تترسب في بول حمضي فقط (الاكسالات ، حمض اليوريك) ، وبعضها تترسب في بول قلوي فقط (الفوسفاتات ، الكربوناتات) .

٢-٩ اختبار الحمل . الطريقة : اختبار اللاتكس بالشريحة

٢-٩-١ المبــدأ

يمكن استعمال القياس الكيفي لموجِّهة القُند المشيمائية **chorionic gonadotrophin** البشرية في البول لتحديد كون المرأة حاملاً أو غير حامل . ويُقترح اختبار اللاتكس بالشريحة **latex slide test** كطريقة مختارة . وتظهر موجهة القند المشيمائية البشرية بكميات قابلة للاكتشاف بعد حوالي أسبوع من أول دور حيضي فائت ، وتصل الذروة بين ٥٠ و ٨٠ يوماً من الحمل .

٢-٩-٢ الكواشف

العتائد **kits** التجارية متيسرة في غالبية البلدان .

٢-٩-٣ طريقة العمل

اتبع تعليمات الصانع .

٢-٩-٤ التقــرير

اتبع تعليمات الصانع .

٢-١٠ البروتين . الطريقة : حمض السلفوساليسيليك

٢-١٠-١ المبـدأ

تترسب البروتينات بحمض السلفوساليسيليك-٥ . والعَكَر الناتج يعطي تقديراً لكمية البروتين في البول . ويجب نزع الخلايا والأسطوانات من البول بالتنبيذ قبل اجراء الاختبار .

٢-١٠-٢ الأجهزة والكيمياويات

- منبذة ، متعددة الأغراض ، أو ورق ترشيح
- اسطوانة قياس (١٠٠ مل)
- ممصات مدرّجة (٢ مل بتدريج ٠,١ مل)
- قمع ، زجاجي أو لدائني (بلاستيكي) (بقطر ١٠٠ مم)
- بصلة مطاطية
- أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
- حوجلة مقياس حجمي (٥٠٠ مل)
- حمض الاسيتيك ، الجليدي . تحذير : حمض الاسيتيك أكال قوي
- حمض السلفوساليسيليك-٥
- ورق باهاء أو مقياس باهاء

٢-١٠-٣ الكواشـف

١ - **محلول حمض السلفوساليسيليك-٥ ٦٠ غ/ل (٦٪ وزن/حجم)** . زن ٣٠ غ من حمض السلفوساليسيليك-٥ ، وذوّبها في ماء مقطر وأكمل إلى ٥٠٠ مل . هذا الكاشف ثابت لعدة أشهر في درجة حرارة ٢٠ - ٢٥°س .

٢ - **محلول حمض الاسيتيك (١٠٪ وزن/حجم)** . ضع حوالي ٥٠ مل من الماء المقطر في أسطوانة قياس . ثم ضع ١٠ مل من حمض الاسيتيك في أسطوانة القياس باستخدام بصلة مطاطية ، وأكمل الى ١٠٠ مل بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لعدة أشهر في درجة حرارة ٢٠ - ٢٥°س .

٢-١٠-٤ طريقة العمل

١ - تحقق من باهاء جزء من البول ، فإذا كانت قلوية أو متعادلة أضف محلول حمض الأسيتيك ١٠٪ ، قطرة قطرة حتى تصير حمضية (حوالي باهاء ٦) .

٢ - رشّح البول أو انتبذه (٢٠٠٠ - ٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ٥ دقائق) .

٣ - ضع ٢ مل من البول الرائق في أنبوب اختبار .

٤ - أضف ٤ مل من محلول السلفوساليسيليك-٥ وامزج . لا ترج .

٢-١٠-٥ التقـرير

تُشكّل العَكَر ايجابي للبروتين .

سلبي	–	يبقى البول رائقاً
ايجابي	–	أثر : عكر خفيف مقابل خلفية داكنة
+	–	عكر واضح
++	–	عكر شديد ولكن دون تندف flocculation
+++	–	عكر شديد مع تندف خفيف
++++	–	عكر شديد مع تندف شديد

ملاحظة : البول السوي لا يحتوي على بروتين يمكن اكتشافه بهذه الطريقة . وقد يتم الحصول على نتيجة ايجابية كاذبة اذا كان المريض يتعاطى تولبوتاميد ، أو بنسلين أو بعض أدوية أخرى . وقد يسبب التركيز العالي من اليوراتات أيضاً نتيجة ايجابية كاذبة .

٢-١١ اختبارات شرائط الغمس dip-stick tests : **ملاحظات عامة**

٢-١١-١ المبـدأ

في هذا النظام تُشرَّب الكواشف في شرائط من ورق الترشيح . ومبادىء التفاعل في كل طريقة مماثلة لتفاعلات السوائل ، ولهذا يمكن تطبيق نفس المتغيرات على الزمرتين . وتستعمل شرائط الغمس على نطاق واسع في فحص البول الروتيني لسهولة استعمالها والسرعة التي يتم بها الحصول على النتائج . ولكن حالياً تحدّ عدة عوامل من تطبيقها في البلدان النامية ، مثلاً : التكاليف ، والامداد المنتظم ، والنقل ، والتخزين .

٢-١١-٢ طريقة العمل

عند استعمال شرائط الغمس ، من الضروري اتباع تعليمات الصانع بدقة فيما يتعلق بالاستعمال والتخزين . ويجب أن يكون المستعملون على حذر بصفة خاصة من احتمال وجود مواد متداخلة interfering substances كما تبين تعليمات الصانع .

٢-١١-٣ ضـبط الجـودة

يجب اخضاع اختبارات شرائط الغمس لاجراءات ضبط الجودة شأنها شأن التحليلات الأخرى . ويمكن التحقق منها باستعمال المقترحات المذكورة في القسم ٢-٢ « ضمان الجودة » ، أو باستعمال ضوابط من البول المجفد lyophilized المتوافر تجارياً .

ملاحظة : مرجعان عامان لاختبارات البول : [7,2] .

٣ - الاختبارات الدموية

٣-١ أخذ نماذج الدم للاختبارات الدموية

يجب أن تصل الى المختبر عيّنة sample تكفي لاجراء الاختبار المطلوب في أسرع وقت ممكن بعد أخذ الدم وينبغي أن تأتي في وعاء ملائم عليه لصاقة مناسبة تحديد الهوية . ويجب بذل عناية لضمان عدم حدوث انحلال دم hemolysis للعيّنة أثناء جمعها أو خزنها .

والخطوة الأولى في جمع الدم هي التوسيم labelling أي تحديد المريض بكتابة اسمه مع أي رقم مميِّز على الوعاء الذي سيوضع الدم فيه . ثم يجب طمأنة المريض والعمل على تهدئة مخاوفه قبل البدء . ويجب أخذ الدم قدر المستطاع في نفس الظروف كلّ مرة ، مثلاً عندما يكون المريض مستريحاً ، أو في الصباح أو قبل الأكل .

الدم الوريـدي

يجب أن تكون الابر والزرّاقات المستخدمة في بزل الوريد venipuncture جافة ومعقمة . والأفضل سحب الدم من الوريد أمام المرفق بواسطة زراقة زجاجية أو بلاستيكية . ويجب أن لا يكون تجويف الإبرة أضيق مما ينبغي . والابر المناسبة هي من عيار ١٩-٢١ بطول ٢٥-٤٠ مم . وفي البلدان التي يشكل التهاب الكبد البائي hepatitis B أو التهاب الكبد اللاألفي-اللابائي non-A non-B فيها مشكلة هامة ، يجب اتخاذ احتياطيات إضافية لتجنب التلوث .

وأفضل وضع للمريض هو أن يكون مستلقياً . وإذا كان المريض جالساً ، فيجب دعم الذراع لتبقى ثابتة . ويجب فحص الأوردة وتقييمها بوضع عاصبة tourniquet على العضد ، ويجب أن تكون العاصبة مشدودة بدرجة تكفي لمجرد إعاقة العَوْد الوريدي . نظِّف الجلد بكحول ٧٠٪ ودعه يجف . ثبِّت الوريد في موضعه بضغط الأنسجة الرخوة وسحبه بالابهام تحت موقع البزل المقصود مباشرة . أدخل الإبرة في الوريد ، وفُك العاصبة على الفور إن أمكنك ذلك ثم اسحب مكبس الزراقة ببطء ، ودع الدم يملأ الزراقة دون تطبق ضغط سلبي . وبعد الحصول على الكمية المطلوبة من الدم ، اسحب الإبرة . وضع مربعاً من الشاش المعقم على موقع البزل واضغط عليه ، وارفع الذراع لايقاف المزيد من النزف .

افصل الإبرة عن الزراقة وأفرغ الدم بعناية من الزراقة في الوعاء الموسوم بلصاقة التعريف . واذا كان يلزم استعمال مضاد للتخثر ، امزج الدم مع مضاد التخثر بسرعة مزجاً جيداً ، ولكن أفعل ذلك برفق لمنع حدوث الرغوة وتلف الكريات .

وفي دليل مختبرات مراكز مكافحة المرض CDC/LAB [1] معلومات عن تنظيف الزراقات والإبر وتعقيمها .

الدم الشعيري

يتمّ الحصول على الدم الشعيري بوخز puncture الجلد بواخزة lancet . والموقع المفضّل في البالغين والأطفال هو جانب الإصبع أو شحمة الأذن ، وفي الرضّع جانب العقب . ويجب استعمال واخزة معقمّة وجافة . واستخدام الواخزات الوحيدة الاستعمال disposable يضمن منع انتقال فيروس التهاب الكبد . وعند استخدام واخزة متكررة الاستعمال يجب تسخينها في اللهب الى درجة التوهّج ثم تركها حتى تبرد قبل الاستعمال لمنع انتقال الخمج infection .

ويجب أن يكون الوخز عميقاً بدرجة تكفي لحدوث نزف طليق . فالجريان الطليق للدم ضروري ، ولا يجوز العصر squeezing إلا بلطف بالغ ، والأفضل أن تتقاطر قطرات كبيرة من الدم ببطء وبصورة تلقائية . وإذا كان الجلد بارداً وزراقياً cyanosed فلا يمكن التعويل على النتائج . وقد تدعو الحاجة إلى غسل الجلد بماء ساخن أو فركه بشدة قبل إجراء الوخز . ويجب مسح القطرة الأولى من الدم بشاش جاف لأنها تحتوي على سائل نسيجي .

استعمال الإيديتات (EDTA) والهبارين كمضادات للتخثر

أملاح إيديتات الصوديوم أو البوتاسيوم مضادات للتخثر قوية ، وهي مضادات التخثر المفضلة في العمل الروتيني في الدمويات . والتركيز المحبّذ هو ملح ثنائي البوتاسيوم ١,٥ مغ لكل مل من الدم . وفرط الإيديتات يضر الكريات الحمراء والبيضاء فيسبب انكماشها وتغيرات تنكسية فيها . ووجود الإيديتات بما ينوف على ٢ مغ/مل قد يسبب انخفاضاً كبيراً في الكسر الحجمي للكريات الحمراء packed cell volume وزيادةً في تركيز الهيموغلوبين الوسطي في الخلية . ولهذا يجب إضافة الكمية الصحيحة من الدم إلى مضاد التخثر . ويجب مزج الدم بمضاد التخثر مزجاً جيداً بالتقليب المتكرر للوعاء .

الهيبارين لا يؤثر على حجم الكرية الحمراء وهو أقل من الإيديتات إحداثاً لانحلال الدم . ويمكن استعماله بتركيز ١٥–٢٠ وحدة دولية لكل ميليلتر من الدم . ولكن يجب عدم استعمال دم معالج بالهيبارين في عمل أفلام الدم blood films لأنه يعطي لوناً أزرق خفيفاً للخلفية ، ولا في تعداد الكريات البيضاء لأنه يميل إلى جعلها تتلازن clump .

٣-٢ ضمان الجودة

استعمال نماذج شاهدة

لما كان التحقّق من الدقة precision بتكرار الاختبارات عدة مرات على جميع نماذج المرضى أمراً غير عملي ، فإنه يجب إجراء اختبارات متكررة على نماذج شاهدة control specimen خاصة . ولا يتحتم للتحقق من الدقة أن يعرف المرء القيمة الفعلية للنموذج الشاهد ..ولكن إذا كانت القيمة قد عُيِّنت تعييناً يمكن التعويل عليه ، بواسطة مركز مرجعي مثلاً ، أمكن استخدام المادة الشاهدة للتحقق من المضبوطية accuracy أيضاً . ويفضل استعمال شواهد ذات قيم سوية ، ومرتفعة ومنخفضة إن تيسّر ذلك .

وقد تكون النماذج الشاهدة دماً كاملاً عومل بمضاد تخثّر ، أو جميعة pool محفوظة من الكريات الحمراء أو البلازما (المصورة) أو المصل ، حسب الاختبار .

ويُنصح باستعمال نموذج شاهد واحد على الأقل لكل وجيبة batch من الاختبارات حتى ولو اقتصرت على نموذج واحد فقط . وإذا كانت الوجيبة كبيرة ، فينبغي أن يوجد شاهد لكل ٢٠ من نماذج المرضى .

ولما كان القصد من إدخال الشواهد في نظام الاختبار هو محاكاة الاعتيان sampling العشوائي (أي أخذ العينات عشوائياً) فمن الضروري معاملتها معاملة نماذج المرضى تماماً .

ويعطى دليل مختبرات مراكز مكافحة المرض CDC/LAB [1] معلومات إضافية عن استعمال النماذج الشاهدة وصحائف تضبيط الجودة .

الاختبارت الكيفية

إن الطريقة المتبّعة لضمان معوّلية reliability القياسات المجراة في الاختبارات الكيفية ، كما في اختبار التَمَنْجُل sickling test مثلاً ، حيث تعطى النتائج على أنها ايجابية أو سلبية ، تكون باشراك عيّنات إيجابية وسلبية معروفة في كل وجيبة قيد الاختبار .

التحقق من أشكال الكريات

إن تقييم اشكال الكريات في لطاخات الدم ونقي العظم يكون شخصانياً subjective إلى حد كبير أي يختلف من شخص فاحص إلى آخر . وهو يعتمد أيضاً على كون اللطاخة قد تمّ تحضيرها جيداً ومعاملتها معاملة جيدة بملوّنات عالية الجودة . ويجب التحقق من معوَّلية هذا الاجراء بصورة منتظمة من قِبَل مشرفين وعن طريق تبادل الشرائح مع مختبرات أخرى . ويجب أن يقوم صغار العاملين كلما سنحت الفرصة باطلاع المشرفين على جميع الشذوذات الهامة التي يلاحظونها من أمثال

الكريات البيضاء الفتية ، أو قلة الصفيحات ، أو التغيرات الكبيرة في الكريات الحمراء . ويجب أن تشمل زيارات المشرفين من كبار العاملين للمختبرات الصغيرة فحوصاً لشرائح الدم . والمناقشات التي تعقد على أساس منتظم داخل القسم حول المستحضرات ذات الأهمية الخاصة ، وسيلة هامة لتنشيط الاهتمام والاستزادة من المعرفة بالتقييم الصحيح لأشكال الكريات في أفلام الدم ولطاخات نقي العظم . ويمثل التقييم الدقيق لأفلام الدم مشعراً مفيداً بالأخطاء الكبيرة في مَنَاسب indices الكريات الحمراء ، وفي تعداد الكريات البيضاء والصفيحات ، ويوفّر معلومات سريرية مفيدة .

٣-٣ **الهيموغلوبين** (خضاب الدم) . **الطريقة : سيانيد الهيميغلوبين**(١)

٣-٣-١ المبـدأ

يتأكسد الهيموغلوبين في الدم إلى هيميغلوبين haemiglobin بفعل فري سيانيد ferricyanide البوتاسيوم . ويتحد الهيميغلوبين مع السيانيد ليُعطي سيانيد الهيميغلوبين (HiCN) . وتقوم فسفات البوتاسيوم الثنائية الهدروجين بابقاء باهاء pH الكاشف عند القيمة التي تسمح للتفاعلات أن تكتمل في وقت معقول . ويضاف منظف ليعزّز انحلال الدم ويمنع التعكّر ببروتينات المصورة . ويقاس تَمَاصّ absorbance المحلول الناتج في موجة طولها ٥٤٠ ناتومتر (نم) .

٣-٣-٢ الأجهـزة

- الزجاجيات
  - حوجلة حجمية (بحجم ١ لتر)
  - ممصات حجمية (٠,٠٢ مل)
  - ممصات مدرّجة (٥,٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
- المقياس الطيفي – طول الموجة ٥٤٠ نم
- مقياس اللون – مرشحة صفراء + خضراء ، إيلفورد ٦٠٥ (٥٤٠ نم)
- مقياس باهاء pH meter

٣-٣-٣ الكيماويات وتركيب الكاشف

يجب استعمال كيماويات جافة ومن درجة الجودة quality grade .

- فيريسيانيد البوتاسيوم [$K_3Fe(CN)_6$] ٢٠٠ مغ

---

(١) كانت تدعى في الماضي طريقة السيان ميتهيموغلوبين Cyanmethaemoglobin

- سيانيد البوتاسيوم (KCN) شديد السمية . ويجب اتخاذ حذر شديد عند تداول هذا الكاشف والتأكد من سلامة تخزينه . ٥٠ مغ
- فسفات أحادية البوتاسيوم (KH_2PO_4) ٤٠, مغ
- منظف مناسب : فالستيروكس SE (شركة هارتمان ليلون ، فيلادلفيا ، الولايات المتحدة الأمريكية) مناسب . ويمكن استعمال نونيديت P40 (شركة شل الكيميائية وموردي المواد الكيميائية المخبرية) ولكن يلزم ١ مل منه . ٠,٥ مل
- ماء مقطر أو منزوع الأيونات deionized . ١ لتر

يجب أن يكون الكاشف رائقاً ولونه أصفر باهتاً . وعندما يقاس مقابل الماء ككفيء blank في مقياس ضوئي بطول موجة ٥٤٠ نم ، يجب أن تكون قراءة الكثافة البصرية صفراً .

يجب أن تقع باهاء pH الكاشف بين ٧,٠ و ٧,٤ ويجب التحقق منها بانتظام مرة كل شهر على الأقل باستعمال مقياس الباهاء . ويبقى الكاشف محتفظاً بفعاليته عدة أشهر عندما يخزن في درجة حرارة تتراوح بين ٤ و ٢٥°س في قارورة بنيّة من زجاج البوروسيليكات .

واذا تجمد الكاشف عرضياً ، فيجب طرحه . كما يجب طرحه أيضاً إذا تبيّن أن الباهاء واقعة خارج المجال ٧,٠ – ٧,٤ ، أو إذا صار الكاشف غائماً أو تغير لونه ، أو إذا كان للكاشف عند قياسه بطول موجة ٥٤٠ نم مقابل الماء ككفيء تماصّ absorbance غير الصفر .

والكاشف المحضّر ، رغم احتوائه على السيانيد ليس ضاراً نسبياً . إذ لابد من تناول حوالي ٤ لترات منه كي يكون له تأثير مميت .

وبدلاً من الكاشف الموصوف آنفاً ، ثمة كاشف آخر هو كاشف درابكين Drabkin ، أو منتجات مماثلة له يتوافر بعضها على شكل مسحوق أو أقراص يمكن استخدامها في قياس الهيموغلوبين . ولكن يجب أن لا ننسى أنه عند استعمال هذه الكواشف ، يستغرق التحوّل الكامل لمشتقات الهيموغلوبين الى سيانيد الهيميغلوبين حوالي ٢٠ دقيقة ، وأن المحلول الناتج غالباً ما يكون عكراً قليلاً مما يؤدي إلى اعطاء نتائج مرتفعة .

٣-٣-٤ نموذج الدم Specimen

يمكن أن يؤخذ نموذج الدم من وخزة للشعيرات الدموية تنزف بطلاقة (الأصبع ، أو العقب في الرضع) ، أو يمكن أخذه بالفصد venesection أي بزل الوريد .

ويجب أن تكون الوخزة الشعيرية عميقة بدرجة تكفي لكي يسيل الدم بطلاقة . وعندما يتحتم اللجوء إلى ضغط أو عصر للحصول على المقدار الكافي من الدم من الوخزة ، فسوف يدخل عنصر الخطأ بسبب تخفيف الدم بالسائل النسيجي . أما النموذج الوريدي فيمكن أخذه على أي مضاد

للتخثر صلب (كالإيديتات EDTA أو مزيج أكسالات الأمونيوم والبوتاسيوم ، أو الهيبارين) . وقبل أخذ عينة الفحص من النموذج يجب مزج الدم جيداً إما بالتقليب برفق ٢٠ مرة على الأقل أو باستعمال أداة مزج آلية مدة دقيقتين أو ثلاثاً ، وهو الأفضل .

٣-٣-٥ طريقة العمل

١ – خفّف ٠,٠٢ مل من الدم فى ٥,٠ مل من الكاشف .

٢ – امزج ودَعْ المزيج مدة ٣ دقائق على الأقل ، ثم اقرأ التَمَاصّ بموجة طولها ٥٤٠ ثم بعد ضبط المقياس الطيفي على الصفر باستعمال الماء المقطر أو الكاشف ككفيء blank .

٣-٣-٦ التعيير

يجب تحضير مخطط تعيير عندما يبدأ استعمال مقياس ضوئي photometer جديد في المختبر ، ويجب تكرار ذلك مرة كل شهر ، أو أكثر من مرّة في حالة وجود أي شك حول أداء الاختبارات .

ولتحضير مخطط التعيير ، يتم إعداد خمسة أنابيب . وتوضع في هذه الأنابيب بممص الكميات الآتية من محلول مرجعي لسيانيد الهيميغلوبين[1] .

الأنبوب ١ : ٦ مل تقريباً
الأنبوب ٢ : ٤,٥ مل مقيسة بدقة
الأنبوب ٣ : ٣,٠ مل مقيسة بدقة
الأنبوب ٤ : ١,٥ مل مقيسة بدقة
الأنبوب ٥ : لا شيء

وبعد وضع المحلول المرجعي بالممص ، يشطف هذا الممص جيداً بالكاشف . وتطرح الغُسالة ثم باستعمال نفس الممص يضاف الكاشف إلى الأنابيب الخمسة كما يلي :

الأنبوب ١ : لا شيء
الأنبوب ٢ : ١,٥ مل مقيسة بدقة
الأنبوب ٣ : ٣,٠ مل مقيسة بدقة

---

(١) يحضر هذا المحلول على المستوى الوطني باضافة دم معروف محتواه من الهيموغلوبين إلى الكاشف بنسبة ١ إلى ٢٥١ (أي ٢٠ مكل « مكرولتر » من الدم إلى ٥,٠ مل من الكاشف) . وقد يحصل المختبر المركزي على محلول مرجعي دولي من سيانيد الهيميغلوبين لمنظمة الصحة العالمية ، من المعهد القومي للصحة العمومية في أوتريخت ، هولندا Institute of Public Health, Utrecht, Netherlands والمحلول المرجعي لسيانيد الهيميغلوبين متوافر أيضاً لدى المورّدين التجاريين .

الأنبوب ٤ :   ٤,٥ مل مقيسة بدقة
الأنبوب ٥ :   ٦ مل تقريباً

وبذلك تكون تراكيز الهيموغلوبين في الأنابيب الخمسة على التوالي كما يلي : القيمة المدونة على لصاقة التعريف (كامل القوة) ، $\frac{٣}{٤}$ القيمة المدونة على لصاقة التعريف ، $\frac{١}{٢}$ القيمة المدونة على لصاقة التعريف ، $\frac{١}{٤}$ القيمة المدونة على لصاقة التعريف ، والقيمة صفر (الكفيئة blank) .

ويجب عمل القياسات بدقة من ممص قريب في الحجم من الحجم المطلوب (مثلاً : ممص ٥ مل مدرج) . ويجب استعمال نفس الممص لجميع القياسات . كما يجب أن تكون المحاليل المستعملة في درجة حرارة الغرفة .

وتقرأ محتويات الأنابيب ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ في موجة طولها ٥٤٠ نم .

أعمل مخططاً للتعيير بوضع قراءات التَمَاصّ على المحور العمودي وتراكيز الهيموغلوبين على المحور الأفقي على ورقة بالرسم البياني . ويجب أن تقع النقاط على خط مستقيم يمر خلال الصفر .

٣-٣-٧ الحســاب

تُقرأ قِيم الهيموغلوبين لنماذج الدم من مخطط التعيير ، أو من جدول يمكن إعداده من المخطط .

٣-٣-٨ تضبيط الجودة

تباين الشروط المثلى optimal conditions variance : يجب تحقيق معامل اختلاف coefficient of variation تقرب من ٣٪ .

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدى هذه القيم ٦٪ .

يجب استعمال محلول مرجعي من سيانيد الهيميغلوبين مع كل سلسلة من العينات للتحقق من مخطط التعيير أو جدول التعيير .

٣-٣-٩ المراجع

الطريقة المحبّذة لتعيين تركيز الهيموغلوبين في الدم . إعداد فان اسنديلفت O.W. Assendelft ، وهولتز A.H. Holtz ، ولويس S.M. Lewis (WHO/LAB/84.10) لصالح منظمة الصحة العالمية .

٣-٤ أفلام الدم الرقيقة : التحضير والتلوين والفحص

لا يتناول هذا الكتيب تحضير أفلام الدم الثخينة . وتوجد التفاصيل في دليل المختبرات لمراكز مكافحة المرض (CDC/LAB) [1] .

٣-٤-١ تحضير أفلام الدم الرقيقة

يمكن تحضير أفلام الدم من دم شعيري أو وريدي على النحو التالي :

- يُحضَّر فلم الدم على شريحة مجهرية ، والشرائح المستعملة لهذا الغرض ينبغي أن تكون على الوجه الأمثل من حيث النظافة والجفاف والخلو من الزيت أو الشحم . ويجب أن تكون الشرائح قد غسلت بالصابون والماء وشطفت وحفظت جافة في مرطبان مغطّى أو مغموسة في ٩٥٪ كحول ، وهو الأفضل . وقبل تحضير الأفلام ، نظّف الشرائح المحفوظة جافة بقطعة قطن مبللة بالكحول ثم لمّعها حتى الجفاف بشاش أو بمنشفة نظيفة . والشرائح المحفوظة في الكحول يجب تلميعها أيضاً حتى الجفاف .

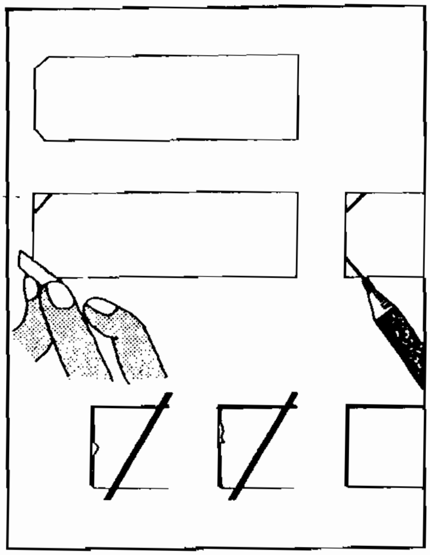
- يلزم لنشر الفلم فارشة spreader . وقد تصنع الفارشة من شريحة مجهرية على النحو الآتي (الشكل ١) .

١ - اختر شريحة لها حافة ملساء تماماً في إحدى نهايتيها .

٢ - اصنع بمبرد أو قلم ماسي علامة مائلة على الزاويتين المجاورتين للحافة الملساء .

٣ - اكسر الزاويتين .

- ضع قرب نهاية الشريحة قطرة صغيرة من الدم (بقطر حوالي ٢-٣ مم) حصلت عليها مباشرة من وخزة الإصبع أو من الأنبوب المحتوي على مضاد التخثر (الإيديتات) بعد المزج الجيد .



الشكل ١

- ضع الشريحة على المنضدة وباستعمال الفارشة التي أعددتها ، افرش قطرة الدم دون إبطاء لتكوّن فلماً رقيقاً ، وذلك على الوجه التالي :

١ - اسحب الفارشة إلى الخلف حتى تلامس قطرة الدم التي تنتشر على طول خط التماس بين الفارشة والشريحة الحاملة للفلم .

٢ - ادفع الفارشة على طول الشريحة بحركة منسجمة ، فتلحق قطرة الدم الفارشة مخلّفة فلماً رقيقاً من الدم طوله ٣-٤ سم على الشريحة المجهرية الحاملة .

(أ) يجب استهلاك كل الدم في القطرة قبل وصول الفارشة إلى نهاية الشريحة الحاملة .

(ب) يجب أن لا يمتد فلم الدم إلى حافات الشريحة الحاملة .

(ج) يجب أن لا يكون فلم الدم مفرط الثخن أو الرقة . ويتوقف الثخن على الزاوية التي تمسك بها الفارشة وعلى سرعة الفرشة .

(د) يجب أن لا يحتوي فلم الدم على ثقوب (من جراء وجود شحم على الشريحة المجهرية) .

٣ - يجب تجفيف القلم بسرعة بتلويح الشريحة في الهواء .

٤ - أكتب ما يعرّف بهوية المريض على الفلم مباشرة قرب البنهارية الثخينة باستعمال قلم رصاص عادي .

٣-٤-٢ تلوين أفلام الدم الرقيقة - طريقة ملوّن غيمزا Giemsa Stain .

١ - المبـدأ

تُثبَّت الأفلام أولاً بالميثانول النقي . والتلوين اللاحق بملّون غيمزا يلوّن الخلايا المختلفة بطريقة تجعل تمييز بعضها من بعض سهلاً خلال المجهر .

٢ - المواد والكواشف

- قضيبان زجاجيان فوق مغسلة أو حوض تلوين
- مخبار (اسطوانة مدرجة) قياس ، ٥٠ مل أو ١٠٠ مل
- ساعة ميقاتية timer clock
- رفرف rack لتجفيف الشرائح
- ميثانول نقي في قارورة قطّارة
- قارورة غسيل تحتوي ماء مدروءاً (الباهاء pH ٦,٨-٧,٠)

تحضير الماء المدروء

قم بتحضير المحاليل الخزينة التالية :

(أ) فسفات أحادية البوتاسيوم ٩,١ غ/ل

(ب) فسفات ثنائية الصوديوم اللامائية ٩,٥ غ/ل أو

فسفات ثنائية الصوديوم ، ثنائية الهيدرات ١١,٩ غ/ل

امزج مقدارين متساويين من (أ) و (ب) . افحص الباهاء pH باستعمال أوراق باهاء ضيقة المجال . يجب أن يكونَ الباهاء pH ٦,٨-٧,٠

تحضير ملوّن غيمزا الخزين

مسحوق ملوّن غيمزا	٠,٧٥ غ
ميثانول (CH_3OH) ، نقي	٦٥ مل
غليسرول	٣٥ مل

ضع المكونات في قارورة تحتوي على خرزات زجاجية ورجّها . رجّ القارورة ثلاث مرات يومياً على أربعة أيام متوالية . رشّح (ارجع الى تعليمات الصانعين مخافة أن تكون الكميات المبيّنة مختلفة) .

قبل الاستعمال بقليل ، خفّف ملون غيمزا الخزين بالماء المدروء بنسبة ١ في ١٠ ، مثلاً استعمل ١٨ مل من الماء المدروء و ٢ مل من الملّون في مخبار (اسطوانة مدرجة) وحرّك بقضيب زجاجي . هذه الكمية تكفي لتلوين أربع شرائح .

٣ – طريقة العمل

١ – ضع الشريحة فوق القضيبين الزجاجيين .

٢ – اغمر الشريحة بالميثانول النقي . واتركها لمدة ٥–١٠ دقائق .

٣ – اطرح الميثانول واغمر الشريحة بملوّن غيمزا . واتركها مغمورة به مدة ١٠–١٥ دقيقة .

٤ – اغسل الملوّن بالماء المدروء ، ولا تطرحه عن طريق إمالة الشريحة لأن هذا سوف يترك راسباً من الملوّن على فلم الدم .

٥ – دع الماء المدروء على الشريحة دقيقتين الى ثلاث دقائق تمييز الفلم . ويختلف هذا الوقت حسب الملون والماء المدروء المستعملين . وأهمية الباهاء pH حيوية في تفريق الكريات البيضاء بملوّن غيمزا ويجب أن تكون بين ٦,٨ و ٧,٠ .

٦ – أمِلْ الشريحة لإراقة الماء المدروء وضعها قائمة في رفرف النزح لكي تجف .

ويوجد وصف لتلوين أفلام الدم ونقي العظم بطريقة رومانوفسكي المقيسة في المطبوعة WHO/LAB/86.1[15] .

٤ – مناقشة حول طريقة العمل ومصادر الخطأ

في فلم جيد التلوين ، تبدو الخلايا على الشكل الآتي :

– العَدِلات neutrophils : تتلون الهيولى cytoplasm بلون قرنفلي خفيف وتحتوي على حبيبات بنفسجية ناعمة .

- الحمضيات أو اليوزينيات eosinophils : تتلوّن الهيولى بلون قرنفلي خفيف وتحتوي على حبيبات حمراء كبيرة .
- الوحيدات monocytes : تتلوّن الهيولى بلون أزرق – رمادي
- اللمفاويات lymphocytes (الكبيرة) : تتلوّن الهيولى بلون أزرق باهت جداً .
(الصغيرة) : تتلوّن الهيولى بلون أزرق باهت .
- القَعِدات basophils : تملأ الخلية حبيبات كثيرة بنفسجية زرقاء قاتمة .
- الكريات الحمراء : تتلوّن بلون أحمر قرنفلي كلون قشرة البصل الناضج .
- الصفيحات platelets : تتلوّن بلون قرنفلي بنفسجي .

وقد يكون الفلم سيء التلوين نتيجة للأسباب الآتية :

١ – يجب أن تكون أفلام الدم جافة تماماً قبل التثبيت ، وإلا فسوف تنشطف المناطق الرطبة من الشريحة بالغسل .
٢ – يجب تثبيت الشرائح بعد التحضير بأسرع ما يمكن ، لأن الكريات البيضاء تميل إلى أن تتشوه وتتلاشى .
٣ – اذا كان الفلم مفرط الزرقة فربّما كانت اللطاخة smear مفرطة الثخانة أو أنها لم تغسل بالقدر الكافي أو طال زمن تلوينها ، أو ربما كان الملّون أو الدارئة مفرط القلوية . استعمل دارئة طازجة .
٤ – اذا كان الفلم مفرط الحمرة ، فربمّا كان الملوّن أو الدارئة مفرطة الحموضة . استعمل دارئة طازجة .
٥ – اذا كان الفلم مفرط الشحوب فمعنى ذلك أن مدة التلوين لم تكن كافية .
٦ – وجود الماء في الميثانول أثناء التثبيت ذو أثر سيء على أشكال الخلايا ، لاسيما الكريات الحمراء ، مما يجعل من الصعب تفسير الفلم . ولهذا فانه من المهم جداً أن تحفظ قارورة الميثانول القطارة مسدودة بإحكام وفي وضعية الاغلاق عندما لا تقطّر الميثانول فعلاً على الشريحة ، وذلك لتحاشي امتصاص الميثانول للرطوبة من الجو .

٣-٤-٣ فحص أفلام الدم الرقيقة

الغرض من هذا الفحص هو البحث عن بعض الشذوذات في خلايا الدم والتحقق من أن الصفيحات موجودة بكميات سوية .

وقد يجري البحث أيضاً عن بعض الطفيليات مثل المتصورات plasmodia والمثقبيات trypanosoma والخييطيات microfilaria بالاضافة الى البورلية Borrelia ، في المناطق التي توجد فيها هذه الطفيليات .

٣-٤-٣-١ طريقة الفحص

ضع قطرة من زيت الغطس immersion oil على الشريحة وضع فوقها ساترة بحيث تغطي ذيل الفلم وجسمه الرئيسي على السواء . ويجب إمساك الساترة بلمس جوانبها فقط ، ولا يجوز لمس سطحيها . افحص الفلم بالتكبير الضعيف (شيئية × ١٠ ، وعينية × ١٠) للحصول على انطباع عام عن أعداد الكريات البيضاء وعن انسجام توزّعها أي عدم افراط في عددها في ذيلي الفلم ، وعن وجود لزنات مرئية من الصفيحات لاسيما في الذيل . ويمكن رؤية الخييطيات بقوة التكبير هذه .

بعد ذلك حوّل الى الشيئية × ٤٠ (التكبير القوي الجاف) ، وافحص الكريات البيضاء . قدّر بالتقريب إن كان عددها الاجمالي سوياً وإن كانت توجد الأنماط الخلوية المختلفة بأعداد سوية . تثبّت من أن ما تشتبه في كونه لزنات من الصفيحات هو حقاً صفيحات ، وقدّر بالتقريب وأنت تنظر الصفيحات الموزعة إفرادياً ، إن كانت موجودة بأعداد سوية أو أن عددها منخفض .

وتقدير كون أعداد الكريات البيضاء والصفيحات ضمن الحدود السوية يمكن تأسيسه فقط على الخبرة المكتسبة من فحص عدد كبير من الأفلام .

وفي التكبير القوي الجاف ، يجب الانتباه إلى وجود أي كريات بيضاء شاذة والتثبيت من ذلك تحت زيت الغطس oil immersion . كما يمكن أيضاً دراسة شكلياء الخلايا الحمراء في باحة الفلم والتثبت من النتائج تحت الشيئية الغاطسة بالزيت . ويجب فحص أشكال الكريات في تلك الباحة من الفلم التي تكون فيها الكريات الحمراء متلامسة فقط وليست متراكبة overlapping . تذكر : أنه من الضروري لدراسة أشكال الكريات أن تكون أفلام الدم محضرة تحضيراً جيّداً وملوَّنة تلويناً جيّداً . ويمكن اكتشاف المتصورات والمثقبيات في هذا التكبير .

وللفحص تحت الشيئية الغاطسة بالزيت ، ارفع الساترة بعناية فوق حافة الشريحة بدبوس مثلاً أو عود مطباق applicator stick ، وارفعها بعناية بدون توسيخ السطح العلوي وانقلها إلى الشريحة التالية .

بعد ذلك دوِّر مجموعة العدسات الشيئية turret of objectives نصف دورة وضع قطرة أخرى من زيت الغطس على الشريحة ودوِّر لتجعل العدسة الغاطسة في موضعها الملائم . أعد فحص أشكال الكريات الحمراء والكريات البيضاء . ويمكن تعداد مختلف أنماط الكريات البيضاء في كل مئة كرية ، وهو ما يسمى بالعد التفريقي للكريات البيضاء differential leukocytes count أو الكسور العددية للكريات البيضاء أو الصيغة الكروية .

ويمكن اكتشاف البورلية Borrelia بهذا التكبير ، كما يمكن تعيين نمط المتصورات .

٣-٤-٣-٢ أشكال الكريات الحمراء

١ - المبدأ

تفسِّر الفروق الفردية في فيزيولوجيا الكريات الحمراء وبنيتها التغيرات الطفيفة في الأشكال التي غالباً ما تُرى . وفي بعض الأمراض ، ولاسيما أمراض فقر الدم anaemia ، قد تكون في الكريات شذوذات في الشكل أو الحجم أو اللون أو فيها جميعها .

وأهم المظاهر التي يجب تمييزها هي نقص الصباغ hypochromia وكثرة الكريات الكبرية macrocytosis . ويجب التعرّف على الكريات الحمراء المنوَّاة nucleated . كما ينبغي البحث عن الكريات المنجلية في المناطق التي يحدث فيها فقر الدم المنجلي sickle cell anaemia .

٢ - نقص الصباغ

السمة الرئيسية لنقص الصباغ هي زيادة شحوب الكريات الحمراء تفوق المعتاد . فهي تميل في العادة إلى أن تكون أصغر من السوية وفيها تغايرات أكبر في الشكل والحجم . وقد يكون الشحوب واضحاً جداً في حالات فقر الدم الشديد . وفي حالة الشك ، قارن الفلم مع أفلام دم سوي .

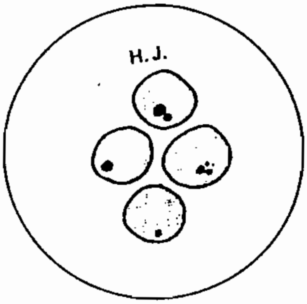
ونقص الصباغ يعني عادة فقر الدم بعوز الحديد iron deficiency anaemia وقد يدلّ على التلاسيمية thalassemia في المناطق التي تنتشر فيها التلاسيمية أو قد يدلّ على اجتماع المرضين . ويصعب جداً - بل قد يتعذر - مع الأسف ، التمييز بين هاتين الحالتين في فلم الدم .

٣ - كثرة الكريات الكبرية في فقر الدم الضخم الأرومات

السمة الرئيسية لكثرة الكريات الكبرية هي الزيادة في حجم الكريات الحمراء عما هو معتاد . وحيث أن الخلايا الفردية تتباين كثيراً في الحجم والشكل مع كون الكثير منها أصغر من السوية ، فانه يجب تقدير عدد الخلايا التي تكون أكبر من السوية . وهي تميل غالباً إلى أن تكون بيضوية . ولتقدير الحجم تؤخذ نواة الكرية اللمفية الصغيرة على أنها مساوية لحجم الكرية الحمراء السوية . واذا كانت على الخلايا الكبرى مسحة من الزرقة ، فالأرجح أن تكون كريات شبكية reticulocytes لا كريات كبرية . ويمكن التحقق من ذلك بعمل تعداد للكريات الشبكية ، يجب أن يكون سوياً في فقر الدم الضخم الأرومات megaloblastic anaemia الذي لم يعالج .

وعند تقييم فلم فيه كثرة الكريات الكبرية ، يجب البحث بدقة في الكريات الحمراء عن حبيبات مستديرة بنفسجية قاتمة ترى بسهولة ، يطلق عليها أجسام هاول-جولي Howell-Jolly (الشكل ٢) . ووجود مثل هذه الحبيبات أو الأجسام بيِّنة مُثْبِتَة على وجود فقر الدم الضخم الأرومات . ويميل عدد الصفيحات إلى الانخفاض . وكذلك يميل عدد الكريات البيضاء إلى الانخفاض أيضاً

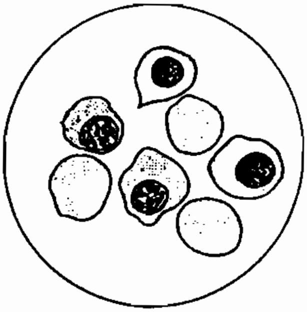
وتميل الكريات البيضاء المفصصة النوى polymorphonuclear إلى أن يكون بها فصوص lobes أكثر من المعتاد ، بحيث تكون الخلايا من ذوات ستة فصوص أو أكثر أكبر عدداً .



الشكل ٢

٤ - الخلايا الحمراء المنَّواة أو الأرومات الحمراء السوية

في بعض حالات فقر الدم الشديد ، لاسيما الانحلالي haemolytic منها ، قد تُرى في فلم الدم كريات حمراء فتية جداً بها نوى . ويكون لون الهيولى قرنفلياً أو أزرق رمادياً ، وتكون النواة بنفسجية قاتمة مجافية للمركز eccentric غالباً مع كروماتين خشن أو تكون كثيفة بانسجام (الشكل ٣) .

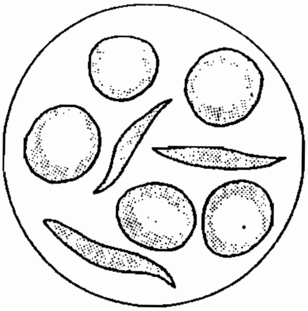


الشكل ٣

ومن المهم تمييزها لأن ذلك قد يساعد على تشخيص نمط فقر الدم . يضاف الى ذلك أنها تتداخل في التعداد الاجمالي للكريات البيضاء .

٥ - فقر الدم المنجلي

السمة الرئيسية لفلم الدم من مريض بفقر الدم المنجلي في أثناء النوبة ، هي وجود الخلايا المنجلية sickle cells . والخلايا المنجلية خلايا حمراء كثيفة التلوين تتباين في الشكل ما بين القصيرة البيضوية وبين الطويلة الإهليلجية أو الضيقة المنحنية (شكل المنجل) ، وجميعها ذات نهايات مؤنقة (الشكل ٤) . وتوجد أيضاً في العادة كثرة من خلايا حمراء منوَّاة .



الشكل ٤

٦ - مصادر الخطأ

(أ) في الأفلام المحضرة تحضيراً سيئاً أو عند استعمال شرائح وسخة ، قد تنتج صوانع أو خوادع artefacts في الكريات الحمراء يمكن أن تحاكي غالبية التغيرات التي ترى في المرض .

(ب) إذا كان الميثانول المستعمل في تثبيت الأفلام يحتوي على رطوبة نتيجة لترك الوعاء مفتوحاً ، قد تحدث تشوهات في الكريات الحمراء يختلط أمرها على الفاحص القليل الخبرة فيحسبها نقص الصباغ .

ويتوافر للمختبرات الصغيرة في وحدة المختبرات بمنظمة الصحة العالمية (WHO/LAB) ، بالمركز الرئيسي ، جنيف ، ملصق ملوّن عن التفريق المخبري لأنواع فقر الدم .

٣-٤-٣-٣ أشكال الكريات البيضاء

١ - المبدأ

الكريات البيضاء في الدم ليست كلها متماثلة . فتوجد منها أنماط خمسة رئيسية تختلف في الحجم وشكل النواة ولون الحبيبات في الهيولى وملامح أخرى . وقد تكون نسبة كل نمط من الكريات البيضاء ذات أهمية تشخيصية . وتسمى نسبة كل نمط الكسر العددي لأنماط الكريات البيضاء type number fraction أو التعداد التفريقي differential count للكريات البيضاء .

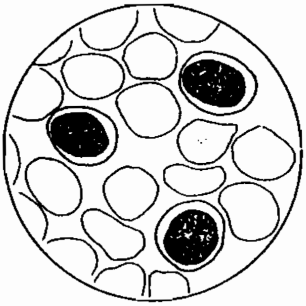
اللمفاوية lymphocyte الصغيرة

الحجم : النواة في حجم كرية حمراء تقريباً (الشكل ٥)

الشكل : مستديرة

النواة : كبيرة تشغل معظم الخلية ، والكروماتين بنفسجي قاتم وكثيف .

الهيولى : يشاهد القليل جداً منها وهي زرقاء بلا حبيبات



الشكل ٥

اللمفاوية الكبيرة

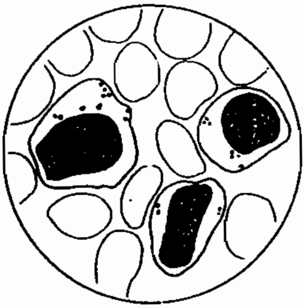
الحجم : أكبر من اللمفاوية الصغيرة (الشكل ٦)

الشكل : مستديرة أو غير منتظمة

النواة : بيضوية أو مستديرة وقد تقع في جانب من الخلية

الهيولى : غزيرة ، وزرقاء باهتة

الحبيبات : قليلة ، كبيرة ، حمراء قاتمة .



الشكل ٦

الوحيدة

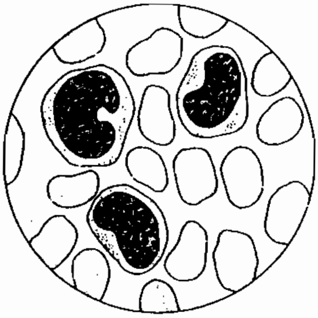
الحجم : أكبر الكريات البيضاء (الشكل ٧)

الشكل : غير منتظم

النواة : متباينة ، لها غالباً شكل الكلوة ، والكروماتين مرتب في خيوط ، ليلكي mauve باهت

الحبيبات : دقيقة الغبار ، محمرة عادة

الفجوات : موجودة عادة في الهيولى



الشكل ٧

في المرضى المصابين بالبرداء (ملاريا) ، تحتوي الهيولى غالباً على كتلٍ بنية – سوداء ، وهذه هي الصباغ البردائي malaria pigment .

الكرية المفصصة النوى العدلة

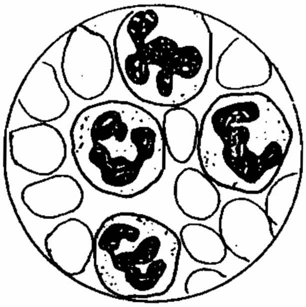
الحجم : أكبر من اللمفاوية الصغيرة (الشكل ٨)

الشكل : مستديرة ، جيدة التحديد

الهيولى : غزيرة ، قرنفلية بعض الشيء

الحبيبات : ليلكية mauve وصغيرة جداً ، عديدة ولكنها منفصلة

النواة : عدة فصوص (٢–٥) ، مرتبطة بخيوط من الكروماتين . يظهر الكروماتين ككتلة منتظمة ، بنفسجية قاتمة .

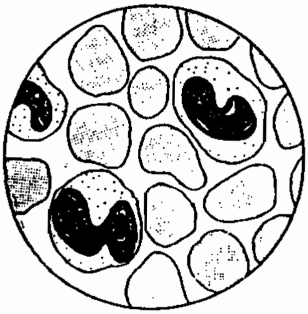


الشكل ٨

(كلما زاد عمر الخلية ، زاد عدد الفصوص في النواة)

الكرية المفصصة النوى العدلة غير الناضجة (الكرية المأطورة band or stab cell)

مماثلة للكرية البيضاء السابقة باستثناء كون النواة لم تنقسم بعد إلى فصوص ، وغالباً ما تكون على شكل S (الشكل ٩) . عندما تُرى الكريات « المأطورة » يكتب كسرها العددي في التقرير كبقية الأنماط الأخرى للكريات البيضاء .



الشكل ٩

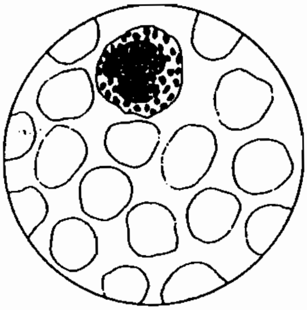
الكرية المفصصة النوى الحمضة

الحجم : مثل العَدِلة (الشكل ١٠)

الحبيبات : كبيرة ومستديرة وحمراء برتقالية ، وعديدة ملتزّة

النواة : عادة من فصين

أحياناً تظهر الخلية تالفة متناثرة الحبيبات .



الشكل ١٠

الكرية المفصصة النوى القَعِدة (الأسِسة)

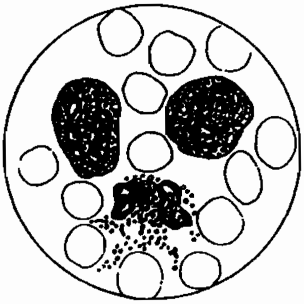
الحجم : مماثلة للعَدِلة (الشكل ١١)

الشكل : مستديرة

الحبيبات : كبيرة جداً ، ومستديرة ، وبنفسجية قاتمة ، وعديدة ولكنها أقل التزازاً من حبيبات الحمضة

النواة : يصعب رؤيتها لأنها تكون مغطاة بالحبيبات

الفجوات : توجد أحياناً فجوات صغيرة عديمة اللون في الهيولى .



الشكل ١١

الخلايا الشاذة

يجب إرسال الشرائح إلى مختبر إحالة referral laboratory .

٣-٥(أ) الكسر الحجمي volume fraction **للكريات الحمراء . الطريقة : مكداس الدم المكروي** Microhematocrit

٣-٥(أ)-١ المبـدأ

الكسر الحجمي للكريات الحمراء أو حجم الخلايا المكدسة packed cell volume (PCV) أو المكداس hematocrit هو حجم الكريات الحمراء معبّراً عنه بكسر من حجم الدم الكامل في العيِّنة . والطريقتان المستخدمتان لتعيين الكسر الحجمي للكريات الحمراء بالتنبيذ هما الطريقة المكروية micromethod والطريقة الكبرية macromethod . وفي كلتا الطريقتين يُنَبَّذ عمود من الدم في

أنبوب منسجم التجويف مغلق في احدى نهايتيه . وقد وجد أن الطريقة المكروية أكثر ملاءمة في مختبرات كثيرة وجرى تبنّيها كطريقة روتينية .

٣-٥(أ)-٢ الأجهزة والكيماويات

- منبذة مكداس الدم المكروي أو منبذة منضدية table top centrifuge برأس لمكداس الدم المكروي ، يجب أن تكون قادرة على توفير ١٠٠٠٠ قوة جاذبية 10000 g على الأقل لمدة ٥ دقائق .
- أنابيب شعرية – أنابيب وحيدة الاستعمال بطول ٧,٥ مم وتجويف منسجم قطره ١ مم . ويجب صنعها من زجاج ذي نقطة انصهار منخفضة ، ويجب أن تكون جدرانها بثخانة ٠,٢ – ٠,٢٥ مم . والمتوافر منها نمطان :

(أ) أنابيب لا تحتوي على مضاد للتخثر للاستخدام مع الدم المعامل بمضاد للتخثر .

(ب) أنابيب تحتوي على وحدتين دوليتين من الهيبارين في كل أنبوب على شكل فلم مجفف ، للاستخدام مع الدم الشعيري المأخوذ مباشرة من وخزة الجلد .

- ختام للأنابيب tube sealant بلاستيكي شبيه بالغضار أو حرّاق غازي للختم بالحرارة .
- قارىء لمكداس الدم المكروي (سلم مصمّم خصيصاً لقراءة المكداس ، ويُقدَّم عادة مع المنبذة) .

٣-٥(أ)-٣ النموذج

دم وريدي ممزوج بإيديتات الصوديوم أو البوتاسيوم ، أو دم شعيري يجمع مباشرة في أنابيب شعرية مبطّنة بفلم من الهيبارين .

٣-٥(أ)-٤ طريقة العمل

١ – يُملأ أنبوب مكداس الدم المكروي بفعل الخاصية الشعرية ، إما من جرح وخزي يسيل بطلاقة أو من عيّنة دم وريدي ممزوجة جيداً . يجب أن يُملأ الأنبوب الشعري إلى ثلثي سعته على الأقل ولكن دون تجاوز ثلاثة أرباع السعة .

٢ – اختم النهاية الجافة لأنبوب الدم بالختام الغضاري clay أو بلهب حرّاق غازي . وتَجَنَّب المبالغة في تقريب الدم إلى اللهب .

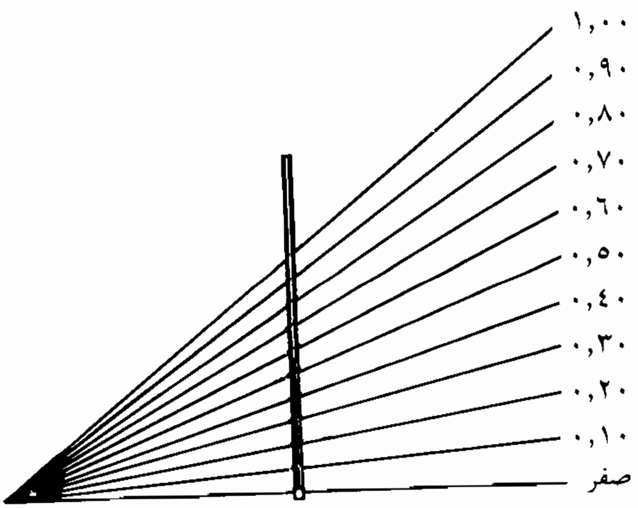
٣ – ضع الأنابيب في الأخاديد الشعاعية radial لرأس منبذة مكداس الدم المكروي ونهاياتها المختومة تواجه الحافة الخارجية .

٤ – نَبِّذْ مدة خمس دقائق . واذا كان الكسر الحجمي للكريات الحمراء أعلى من ٠,٥ . نبِّذ خمس دقائق إضافية لتخفيض الاقتناص البلازمي plasma trapping إلى حده الأدنى . ابحث عن أي تسرب حول قاع الأنبوب .

٣-٥(أ)-٥ الحساب

باستعمال قارىء مكداس الدم ، ضع قاعدة عمود الدم في الأنبوب بمحازاة الصفر ، وقاع هلالة meniscus البلازما بمحاذاة ١,٠٠ (الشكل ١٢) . يمتد عمود الكريات الحمراء من القاعدة إلى الغلالة الشهباء buffy coat دون أن يضم هذه الأخيرة (والغلالة الشهباء هي طبقة صغيرة تضم الكريات البيضاء والصفيحات في كل الأنبوب) . وتؤخذ قيمة الكسر الحجمي للكريات الحمراء مباشرة من القارىء . اذا لم يكن قارىء مكداس الدم متيّسراً ، فيمكن عمل القياس بوضع الأنبوب على ورق رسم بياني حسابي . ويُحسب الكسر الحجمي للكريات الحمراء كما يأتي :

$$\frac{\text{عدد الخطوط المسطَّرة في طول عمود الكريات الحمراء}}{\text{عدد الخطوط المسطرة في العمود الكلي من القاعدة إلى أعلى البلازما}}$$



الشكل ١٢ – أنبوب مكداس الدم المكروي وطريقة قراءة الكسر الحجمي للكريات الحمراء المكدسة

٣-٥(أ)-٦ مصادر الخطأ

١ – عندما يؤخذ الدم بوخز الأصبع ، تمسح القطرة الأولى لأنها قد تحتوي على سائل خلالي interstitial fluid ، وتستعمل القطرات القليلة التالية . يؤدي الضغط الزائد أو العصر إلى جريان السائل الخلالي ، وهذا السائل يميل إلى تخفيف العينة ويسرّع التجلط . ثم إن الركود stasis الطويل يسبب التضييق بالعاصبة tourniquet لمدة دقيقة أو أكثر قد يؤدي إلى ارتفاع كاذب في الكسر الحجمي للكريات الحمراء .

٢ – يجب أن تكون الإيديتات بتركيز ١,٥ مغ/مل دم . فإذا كان حجم الدم في وعاء النموذج قليلاً فإن نسبة الإيديتات تصبح أكثر مما ينبغي وتؤدي هذه الزيادة النسبية في الإيديتات إلى انخفاض كاذب في الكسر الحجمي للكريات الحمراء بسبب انكماش هذه الكريات .
٣ – تخزين النموذج أكثر من ٦ – ٨ ساعات يؤدي إلى زيادة كاذبة في الكسر الحجمي للكريات الحمراء .
٤ – المزج غير الكافي للدم قبل أخذ العينة منه .
٥ – يجب أن يكون الدم جيد الأكسجة وإلا كان الكسر الحجمي منخفضاً انخفاضاً كاذباً .
٦ – وجود جلطة في النموذج قد يكون مصدراً للخطأ .
٧ – في المناخ الحار قد يتلف الهيبارين في الأنابيب الشعرية مالم تخزن الأنابيب في مكان بارد .
٨ – التنبيذ لفترة قصيرة أو بسرعة منخفضة قد لا يحقق أكمل تكدس ممكن .
٩ – عند قراءة الأنابيب ، يجب استبعاد الكريات البيضاء والصفيحات . ولكن قد يكون هذا صعباً عندما تكون الطبقات ضعيفة التحديد . وفضلاً عن ذلك يجب تجنب أخطاء القراءة الناجمة عن خطل القراءة parallax .
١٠– قد تنتج أخطاء من جراء اقتناص الكريات البيضاء والصفيحات وخصوصاً البلازما في عمود الكريات الحمراء . وتزيد البلازما المقتنصة في المرضى بكثرة الكريات polycythaemia وببعض حالات أخرى مثل فقر الدم بعوز الحديد ، وفقر الدم المنجلي ، ووجود الكريات الحمر الكروية الوراثي hereditary spherocytosis .
١١– عندما تستعمل المنبذة باستمرار لوقت طويل ، لاسيما في درجة حرارة محيط عالية ، قد تؤدي سخونة المنبذة إلى انحلال العينة .
١٢– الترسبات (تراص الكريات الحمراء ، الانحلال ، أو التلف) التي يسببها ارتفاع حرارة الدم أثناء ختم الأنبوب الشعري .
١٣– تبخر البلازما أثناء التنبيذ أو عندما تترك فترة قبل القراءة .
١٤– تسرب خفي من الأنبوب الشعري .

٣–٥(أ)–٧ **تضـبيط الجودة**

يجب فحص النماذج على نسختين وأن تتفق القراءات بينهما في حدود ٠,٠١ . ويجب إجراء الاختبارات المزدوجة على الدم الممزوج بالايديتات خلال بضع ساعات بين الاختبار والآخر .

٣–٥(ب) **الكسر الحجمي للكريات الحمراء . الطريقة : الطريقة الكبروية**

٣–٥(ب)–١ **المبـدأ**

ينبَّذ الدم مدة ٣٠ دقيقة بسرعة ٢٠٠٠ – ٢٣٠٠ قوة جاذبية في أنابيب وينتروب Wintrobe tubes . والقطر الداخلي لهذه الأنابيب حوالي ٣ مم وطولها حوالي ١١٠ مم . وهي مدرّجة بفواصل

١ م حتى ١٠٠ م . وتستوعب حوالي ١ مل من الدم ولا تتطلب هذه الطريقة المنبذة الخاصة أو رأس المنبذة الخاصة بمكداس الدم المكروي .

٣-٥(ب)-٢ الأجهزة والكيماويات

- أنابيب وينتروب
- ممصات باستور طول ساقها ١٥ سم .
- منبذة قادرة على قوة جاذبية ٢٠٠٠ - ٣٠٠٠ (أي سرعة حوالي ٣٥٠٠ دورة بالدقيقة ، بنصف قطر داخلي ١٥ سم)

٣-٥(ب)-٣ طريقة العمل

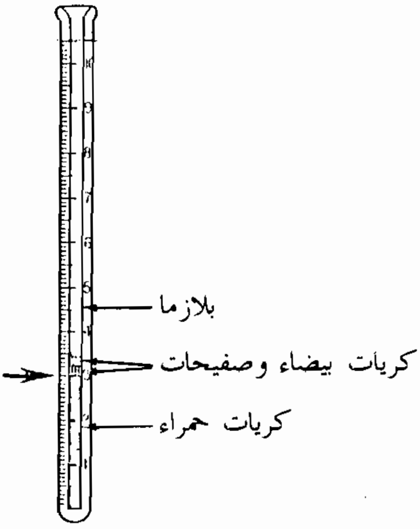
١ - امزج مزجاً جيداً نموذج الدم الوريدي المجموع على الإيديتات .

٢ - خذ عينة بممص باستور واملأ أنبوب وينتروب من القاع مع الحرص على استبعاد فقاعات الهواء . املأ الأنبوب حتى العلامة ١٠٠ بالضبط .

٣ - نَبِّذْ مدة ٣٠ دقيقة بقوة جاذبية حوالي ٢٣٠٠ .

٤ - حالما تتوقف المنبذة ، أُخرِج الأنبوب واقرأ ارتفاع عمود الكريات الحمراء مع استبعاد الطبقتين الحمراء الرمادية والبيضاء للكريات البيضاء والصفيحات (الغلالة الشهباء) (الشكل ١٣) . يعبِّر عن الكسر الحجمي للكريات الحمر ، على شكل كسر من الحجم الكلي للدم .

٥ - إذا كان الكسر الحجمي للكريات الحمر أعلى من ٠,٥ ينبّذ الأنبوب مدة ٣٠ دقيقة أخرى .



الشكل ١٣ - الكسر الحجمي للكريات الحمراء في أنبوب وينتروب .

أنبوب وينتروب بعد التنبيذ يبيّن بصورة مثالية طبقات الكريات الحمراء والكريات البيضاء والصفيحات والبلازما . السهم الكبير على اليمين يشير الى مستوى القراءة لعمود الكريات الحمراء .

٣-٥(ب)-٤ مصادر الخطأ

١ - تركيز خاطىء لمضاد التخثر .
٢ - مزج غير كافٍ للنموذج .
٣ - أكسجة غير كافية للنموذج أثناء المزج .
٤ - جلطة في النموذج .
٥ - خَزْن النموذج أكثر من ٦ - ٨ ساعات .
٦ - ملء ناقص للأنبوب .
٧ - تنبيذ غير كاف - إنقاص الوقت أو السرعة ، مما يؤدي إلى زيادة في المصورة المقتنصة .
٨ - انحلال العينة أثناء التنبيذ ، قد يسببه ارتفاع حرارة المنبذة ، ويمكن اكتشافه بملاحظة مسحة قرنفلية في طبقة المصورة في الأنبوب .
٩ - قراءة مغلوطة .

٣-٦ التركيز العددي للكريات البيضاء (تعداد الكريات البيضاء)

٣-٦-١ المبـدأ

يخفف الدم بسائل يحل الكريات الحمراء دون الكريات البيضاء والكريات الحمراء المنوَّاة . ويحتوي السائل المخفِّف أيضاً على صباغ يلوّن النوى . والخلايا التي يتم عدُّها ليست جميعها بالضرورة كريات بيضاء . وعندما تُظهِر لطاخة الدم كريات حمراء منواة ، فانه يجب تصحيح تعداد الخلايا .

٣-٦-٢ الأجهزة والكيماويات

- معداد الكريات بتسطير نويباور Neubauer ruling وساترة
- ممص ٢٠ مكل (مكرولتر)
- ممص مدرّج ١ مل
- أنابيب ٧٥ × ١٢ مم
- خلاط آلي (اختياري)
- ممصات باستور
- مجهر

٣-٦-٣ الكواشـف

- سائل التخفيف
  - حمض الآسيتيك الجَمُود ٢ مل

– بنفسجية الجنطيان ١٪ محلول مائي ١ مل
– ماء مقطر حتى ١٠٠ مل

٣-٦-٤ النموذج

عينة من دم وريد ممزوج بالإيديتات أو دم شعيري .

٣-٦-٥ طريقة العمل

١ – ضع بالممص مقدار ٠,٣٨ مل من سائل التخفيف في أنبوب اختبار .
٢ – عند استعمال عينة دم ممزوجة بالإيديتات ، امزج العينة جيداً لمدة دقيقتين على الأقل باليد ، أو بخلاط آلي وهو الأفضل .
٣ – املأ الممص الذي سعته ٢٠ مكل بالدم حتى العلامة وامسح الممص من الخارج .
٤ – أفرغ محتويات الممص في السائل المخفف ، واغسله بسحب السائل وتفريغه في الأنبوب عدة مرات . امزج لمدة دقيقتين على الأقل باليد أو بخلاط آلي وهو الأفضل .
٥ – حضِّر معداد الكريات (انظر القسم ٣-٦-٩) وساترته في موضعها المناسب وبواسطة ممص باستور أو أنبوب شعري . اسحب جزءاً من الدم المخفف واملأ به جانِبَيْ معداد الكريات كليهما .
٦ – اترك الخلايا دقيقتين لكي تستقر .
٧ – باستعمال الشيئية ١٠ × وضوء خافت ، عُدّ الخلايا في أربعة مربعات كبيرة على كل من جانِبَيْ الحجيرة (انظر الشكل ١٤) . كل مربع كبير حجمه ٠,١ مكل .
٨ – عند عد الخلايا أَحْصِ الخلايا التي تلامس الخط الأيسر والخط الأعلى الداخلي ، وأهمل الخلايا التي تلامس الخط الأيمن والخط الأسفل الداخلي وذلك لتعويض التوزّع العشوائي عند هامش كل مربّع .

٣-٦-٦ الحساب

احسب تركيز الكريات البيضاء على أساس الخلايا المعدودة والمساحة المعدودة ، والتخفيف :
التركيز العددي للكريات البيضاء

$$= \frac{\text{عدد الخلايا المعدودة (ع)} \times \text{التخفيف (أي ٢٠)} \times ١٠ \times ١٠^{٦}}{\text{عدد المربعات المعدودة بحجم ٠,١ مكل (أي ٤)}}$$

$$= \text{ع} \times ٠,٠٥ \times ١٠^{٩} / \text{ل}$$

واذا كان التعداد أقل من ٣ × ١٠^٩/ل ، كرّر العملية ، واستعمل ٤٠ مكل دم مع ٠,٣٦ من سائل التخفيف (أي تخفيف ١/١٠) . واذا كان التعداد أكثر من ٣٠ × ١٠^٩/ل كرّر العملية واستعمل ٢٠ مكل دم مع ٠,٧٨ مل من سائل التخفيف (أي تخفيف ١/٤٠) .

وإذا كان يوجد أكثر من ١٠ كريات حمراء منوّاه لكل ١٠٠ كرية بيضاء في فلم الدم ، فانه يجب تصحيح التركيز العددي الكلي للكريات البيضاء تبعاً للمعادلة الآتية :

$$\text{التركيز العددي المصحح} = \frac{\text{التركيز العددي غير المصحح} \times ١٠٠}{(\text{كريات حمراء منواة بكل ١٠٠ كرية بيضاء في الفلم}) + ١٠٠}$$

مثال : إذا وجدت ١٢ كرية حمراء منوّاة لكل ١٠٠ كرية بيضاء في فلم الدم ، يكون :

$$\text{التركيز العددي المصحح} = \frac{\text{التركيز العددي غير المصحح} \times ١٠٠.}{(١٠٠ + ١٢)}$$

٣-٦-٧ مصادر الخطأ

١ – تلاشي الكريات البيضاء عند بقاء النموذج مدة طويلة . فيجب عد النموذج خلال ٦ ساعات من أخذه .

٢ – اخطاء التوزيع بالممص والأخطاء في استعمال حجيرة العد لمعداد الكريات :

٢-١ عند استعمال دم شعيري يجب الحصول على قطرة طليقة الجريان .

٢-٢ وعند استعمال دم معامل بمضاد التخثر ، يجب مزج النموذج بعناية بتقليب أنبوب الدم ٢٠ مرة على الأقل قبل أخذ العينة . لا ترجّ الأنبوب لأن الرَجّ قد يسبب رغوة يستحيل معها المصّ بدقة . أمِلْ الأنبوب الممزوج جيداً بزاوية ٤٥° أو أكثر قليلاً ، وقم بالمص من شفة الأنبوب متبعاً نفس إجراءات الدم الشعيري .

٢-٣ يجب أن تكون ممصات أخذ عينة الدم جافة ونظيفة .

٢-٤ يجب ملء الممص بسرعة ويجب سحب الدم بدقة حتى الخط المطلوب باستعمال أنبوب شفط متصل بالممص . وإذا حدث تجاوز طفيف للخط ، يمكن إخراج الدم الزائد بلمس نهاية الممص بقطعة من ورق الترشيح أو الورق الرقيق . أما اذا كان التجاوز أكثر من طفيف فيجب استعمال ممص آخر .

٢-٥ يجب أن لا توجد فقاعات هواء في عمود الدم .

٢-٦ يجب مسح الدم عن الممص من الخارج قبل إدخاله في السائل المخفّف .

٢-٧ بعد إفراغ محتويات الممص في سائل التخفيف ، يجب سحب السائل المخفف في الممص بالمص الثابت عدة مرات لضمان إفراغ كل الدم في السائل .

٢-٨ يجب رج الأنبوب المحتوي على الدم المخفف لمدة دقيقتين على الأقل باليد أو الأفضل برَجّاجة آلية . تُملأ الحجيرة فوراً بعد رجّ الأنبوب بواسطة ممص باستور أو أنبوب شعري .

٢-٩ تملأ الحجيرة بفعل الخاصية الشعرية مع تنظيم جريان السائل من الممص أو الأنبوب الشعري بطريقة تجعل الحجيرة تمتلىء بسرعة وبسلاسة . ويجب أن تُملأ الحجيرة تماماً ولكن يجب ألا يفيض السائل إلى الخنادق . دع الخلايا تستقر في مساحة العد حوالي دقيقتين ، ثم ابدأ العد .

٢-١٠ يجب أن تكون حجيرة معداد الكريات والساترة نظيفتين وجافتين قبل استعمالهما . وتنتج أخطاء خطيرة من بصمات الأصابع أو من فلم زيتي .

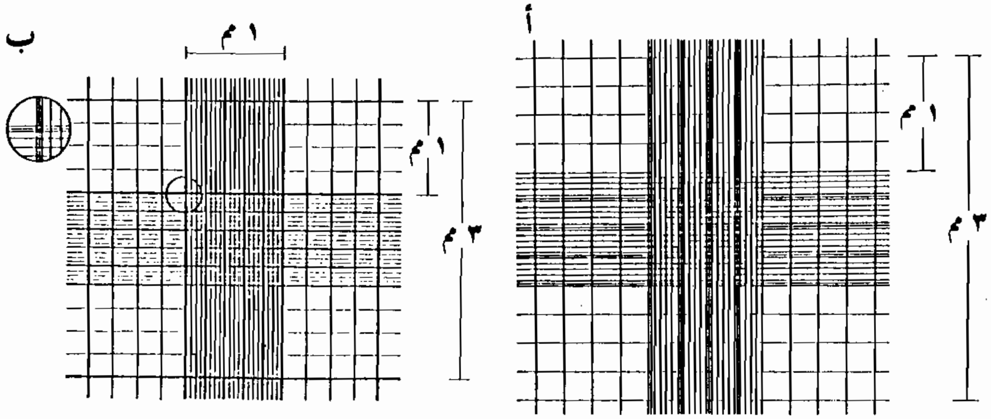
٢-١١ يجب أن يكون أقصى حد لخطأ الممصات ± ١٪ . ويجب عدم استعمال ممصات أقل دقة .

٢-١٢ يجب عدّ عدد كافٍ من الكريات لتقليل الخطأ الناجم عن التوزّع التصادفي chance distribution للخلايا . ويجب عملياً عدّ ١٠٠ كرية على الأقل . ولعمل فحص لمزيد من التحقق من التوزيع الصحيح للكريات في الحجيرة ، يجب أن لا تختلف أعداد الكريات المعدودة في كل مساحة (أي في المربع الكبير) الواحدة عن الأخرى بأكثر من ١٠٪ .

٣-٦-٨ تضبيط الجودة

تفحص عينات مزدوجة من نماذج المرضى . ويجب أن يتماشى التركيز العددي للكريات البيضاء الناتج من حجيرة العد مع كثافة الكريات البيضاء المرئية على اللطاخة .

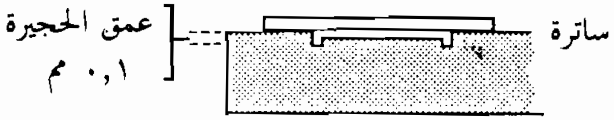
ويجب ضم نماذج شاهدة ، عندما يوفّرها المختبر المركزي ، في كل وجيبة من الفحوص حتى لو احتوت الواحدة منها على نموذج واحد فقط . وإذا كانت الوجيبة كبيرة ، فيجب استعمال شاهد لكل ٢٠ من نماذج المرضى . ويجب أن توضع نتائج الشواهد في رسم بياني على صحيفة التضبيط .



الشكل ١٤ - حجيرة العدّ في معداد الكريات
(أ) نويباور (ب) نويباور المحسّنة

٣-٦-٩ معداد الكريات

إن حجيرة العدّ في معداد الكريات أكانت بتسطير نويباور أم بتسطير نويباور المحسّن ، مصنوعة بطريقة تجعل المسافة بين السطح الأسفل للساترة وسطح الحجيرة ٠,١ (الشكل ١٥) . يحتوي سطح الحجيرة على مساحتين مسطّرتين بطريقة خاصة بالأبعاد المبينة في الشكل ١٤ . والخطوط الحدِّية للميليمتر المربع المركزي مزدوجة وأحياناً ثلاثية . ويوجد في المساحات المركزية ٢٥ مربعاً بتسطير نويباور المحسّن ، و ١٦ مربعاً بتسطير نويباور . ومساحة كل مربع : ٠,٠٤ مم^{٢} (٠,٢ × ٠,٢ مم) . وتنقسم هذه المربعات بدورها إلى مربعات أصغر ، كلٌ منها مساحته ٠,٠٠٢٥ مم^{٢} (٠,٠٥ × ٠,٠٥) . والارباع الخارجية للمساحة المسطرة كلٌ منها ١ مم^{٢} وهي مقسمة إلى ١٦ مربعاً . وتستعمل الأرباع الخارجية الأربعة (= ٤ مم^{٢}) للتركيز العددي للكريات البيضاء وكامل الحجيرة (= ٩ مم^{٢}) للتركيز العددي للصفيحات .



الشكل ١٥ – منظر مقطعي لحجيرة التعداد في معداد الكريات

الحسـابات

صيغة حساب التركيز العددي (تعداد الخلايا/ل) هي :

التعداد (الكريات/ل) = ع × $\frac{ت}{م}$ × ١٠ × $١٠^{٦}$

حيث: ع = العدد الكلي للخلايا المعدودة

ت = عامل التخفيف

م = المساحة الاجمالية المعدودة (مم^{٢})

١٠ = عامل تحويل المساحة إلى حجم بالميكرولتر (مكل)

$١٠^{٦}$ = عامل تحويل التعداد بالمكرولتر (مكل) إلى تعداد باللتر (ل) .

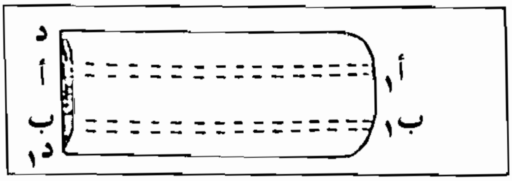
٣-٧ الكسر العددي لأنماط الكريات البيضاء (التعداد التفريقي للكريات البيضاء)

٣-٧-١ المبـدأ

الكسر العددي لأنماط الكريات البيضاء مصمّم لتحديد التواتر frequency النسبي لكل نمط من أنماط الكريات الموجودة . فيتم استعراف وجدولة كل كرية ترى على حدة في فحص نظامي لفلم الدم إلى أن يصل مجموع ما فحص من الكريات إلى مئة كرية بيضاء .

٣-٧-٢ طريقة العمل

عد مختلف أنماط الكريات البيضاء باستعمال الشيئية الكبيرة الجافة أو الغاطسة الزيتية . وعند استعمال الشيئية الكبيرة الجافة يجب وضع قطرة زيت على الشريحة وفوقها ساترة . ويمكن استعمال الساترة لشرائح تالية اذا بذلت عناية في تجنّب تلويث سطحها العلوي بالزيت . ويُفحص الفلم على امتداد مسارب على طول كامل الفلم كما هو مبين في الشكل ١٦ ، مع تجنب الحوافي الجانبية للفلم . وإذا تم عد جميع الخلايا في مثل هذا الشريط ، فسوف تقارب النتيجة الكسر العددي الحقيقي للكريات البيضاء .



الشكل ١٦ - رسم تخطيطي* يوضح الطريقة الطولانية لتعين الكسر العددي

فالقطرة الأصلية من الدم تنتشر بين الفارشة spreader والشريحة كاملة (د-د١) . ويُعمل الفلم بحيث إن شرائط تمثيلية representative في الفلم مثل أ-أ١ و ب-ب١ ، تتكون من الدم الموجود في الأصل عند أ و ب على التوالي . ولكي يمكن إجراء تعيين دقيق للكسر العددي ، يجب فحص وتصنيف جميع الكريات البيضاء في شريط مثل (أ-أ١) و (ب-ب١) أو أكثر .

يستعمل - إذا تيسر - عداد خلايا تفريقي . وهذا الضرب من الآلات له لوحة مفاتيح فيها مفتاح لكل نمط من أنماط الكريات البيضاء ، ويسجل عدد كل نمط تلقائياً .

وعندما لا يتاح عداد الخلايا يمكن استخدام الطريقة الآتية .

استخدم قلم رصاص وورقة لتسجيل مختلف أنماط الكريات البيضاء عند عدِّها . أجر العملية على النحو الآتي :

* عن المرجع التالي : Practical Haematology. Dacie, Sir John V. & Lewis, S.M., 6th Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1984.

ارسم جدولاً (الشكل ١٧) فيه :

(أ) أعمدة خمسة عمودية تحمل الأحرف : ع (الكريات العدلة المفصصة النوى) ؛ ح (للكريات الحمضة المفصصة النوى) ؛ ق (للكريات القعدة المفصصة النوى) ؛ ل (للمفاويات) ؛ و (للوحيدات) . واذا وُجدَ كثيرٌ من العَدِلات المفصصة النوى غير الناضجة أو الكريات المأطورة band or stab فيجب إضافة عمود يحمل الحرف م (مأطورة) .

(ب) عشرة أسطر أفقية .

	ع	ح	ق	ل	و
١	𝍷𝍷𝍷𝍷	𝍷𝍷		𝍷𝍷𝍷	𝍷
٢	𝍷𝍸	𝍷		𝍷𝍷𝍷	
٣	𝍷𝍷𝍸			𝍷𝍷𝍷	
٤	𝍷𝍷𝍷𝍷	𝍷	𝍷	𝍷𝍷𝍷	𝍷
٥	𝍷𝍷𝍷𝍸			𝍷𝍷	
٦	𝍷𝍷𝍸	𝍷		𝍷𝍷	
٧	𝍸			𝍷𝍷𝍷	𝍷𝍷
٨	𝍷𝍷𝍸	𝍷		𝍷𝍷	
٩	𝍷𝍸	𝍷		𝍷𝍷𝍷	
١٠	𝍸	𝍷		𝍷𝍷𝍷𝍷	
المجموع	٥٩	٠٨	١	٢٨	٤
	٠,٥٩	٠,٠٨	٠,٠١	٠,٢٨	٠,٠٤

الشكل ١٧

وعندما تكتمل عشر شُطَب strokes في السطر الأول تَحَوَّلْ إلى السطر الذي يليه . وهكذا فإنك باستكمال السطر العاشر ، تعرف أنك قد عددت ١٠٠ خلية . وفي العمل المخبري الروتيني يكفي عادة عدّ ١٠٠ كرية بيضاء متتالية على لطاخة دم ملوّنة . ولكن إذا كان الكسر العددي لأنماط الكريات البيضاء شاذاً ، فيجب عدّ ١٠٠ كرية بيضاء أخرى ثم تحسب الكسور . وإذا كانت توجد كريات بيضاء شاذة ولكن لا يمكن تعيين هويتها فيجب إحالة شريحة الدم إلى مستوى مرجعي أعلى .

٣-٧-٣ الحساب

اجمع الإجمالي كل عمود في الجدول . هذه الأعداد الإجمالية تعطي النسبة المئوية لكل نمط من أنماط الكريات البيضاء . وتُحَوَّل هذه الأعداد إلى كسور عشرية بوضع علامة عشرية على يسار رقمين (في بعض الحالات قد يستدعى ذلك إدخال صفر) . وهكذا ففي آخر سطر من الجدول الموضح فإن العدد ٥٩ يصير ٠,٥٩ عدلات ، والعدد ٨ يصبح ٠,٠٨ حمضات ، والعدد (١) يصير : ٠,٠١ قعدات والعدد ٢٨ يصير : ٠,٢٨ لمفاويات ، والعدد ٤ يصبح ٠,٠٤ وحيدات .

٣-٧-٤ مصـــادر الخطأ

إن الكسر العددي الملاحظ للكريات البيضاء لا يتوقف على مجرد الفروق المصطنعة في التوزع الناجمة عن عملية الفرش ، وإنما يتوقف أيضاً على اختلافات في التوزع العشوائي . وهذان الأمران معاً هما أهم الأسباب على الإطلاق للتعدادات اللامعوَّلة . وبلغة عملية ، نقول : إن التباين الناجم عن التوزع العشوائي ، حتى في أفلام جيدة الإعداد ، يعني أنه عند تعداد ما مجمله ١٠٠ كرية بيضاء مع كسر حقيقي للعدلات يبلغ ٠,٥٠ ، يكون المجال (± ٢ انحراف معياري) الذي يقع ضمنه ٩٥٪ من التعدادات ، هو حوالي ± ١٤٪ ، أي ٠,٣٦ – ٠,٦٤ عدلات ، وبتعداد ٢٠٠ كرية بيضاء يمكن أن يضيق هذا المجال إلى ٠,٤٠ – ٠,٦٠ ، وبتعداد ٥٠٠ كرية يضيق إلى ٠,٤٤ – ٠,٥٦ .

٣-٧-٥ تضبيط الجودة

يجب توجيه عناية كبيرة للحصول على أفلام دم للفحص جيدة التحضير وجيدة التلوين . وللتحقق المباشر من طريقة العمل ، يجب تلوين شرائح لتضبيط الجودة مثبَّتة ومورّدة من المختبر المركزي . وفحصها إلى جانب أفلام النماذج . وكذلك سوف يُعطِي تكرار التعداد على شرائح منتقاة في اليوم التالي مشعراً بمجال تباين النتائج .

٣-٧-٦ القيم المرجعية

قد تتباين المجالات المرجعية للكسور العددية للكريات البيضاء في جمهرات سكانية مختلفة ، ويجب لذلك تثبيتها في المختبر المركزي . والأمثلة المعطاة أدناه توضيحية لما هو موجود في كثير من البلدان الغربية والصناعية :

	الوليد	اليوم الرابع	السنة العاشرة	البالغون
العدلات المفصصة النوى	٠,٥٥–٠,٦٥	٠,٤٠–٠,٤٨	٠,٤٥–٠,٥٥	٠,٥٥–٠,٦٥
الحمضات المفصصة النوى	٠,٠٢–٠,٠٤	٠,٠٢–٠,٠٥	٠,٠٢–٠,٠٥	٠,٠٢–٠,٠٤
القعدات المفصصة النوى	صفر–٠,٠١	صفر–٠,٠١	صفر–٠,٠١	صفر–٠,٠١
اللمفاويات	٠,٣٠–٠,٣٥	٠,٤٠–٠,٤٨	٠,٣٨–٠,٤٥	٠,٢٥–٠,٣٥
الوحيدات	٠,٠٣–٠,٠٦	٠,٠٥–٠,١٠	٠,٠٣–٠,٠٦	٠,٠٣–٠,٠٦

وهكذا يُظهر توزّع الأنماط المختلفة للكريات البيضاء طرازين أساسيين :

١ – طراز فيه أغلبية من اللمفاويات : الرضّع والأطفال تحت السنة العاشرة من العمر .

٢ – وطراز تكون الأغلبية فيه للعدلات المفصصة النوى : البالغون والأطفال فوق السنة العاشرة والولدان (حديثو الولادة) .

٣–٨ التركيز العددي للصفيحات (تعداد الصفيحات)

٣–٨–١ المبـدأ

يخفف الدم بمخفِّف يسبب انحلالاً للخلايا الحمراء . يُملأ معداد الكريات بالدم المخفَّف ، وتُعَدُّ الصفيحات ويفضل أن يكون ذلك باستعمال مجهر متباين الصفحات phase-contrast microscope اذا تيسّر .

٣–٨–٢ الأجهزة والكيماويات

– معداد الكريات بتسطير نويباور وساترة (انظر الشكل ١٤)
– مجهر عادي أو إن تيسر مجهر متباين الصفحات مجهز بمكثِّفة طورية ، مسافة العمل فيها طويلة
– ممص ٢٠ مكل
– ممص مدرَّج (١) مل
– أنبوب ٧٥ × ١٢ مم
– خلاط آلي
– ممصات باستور
– أكسالات الأمونيوم

٣–٨–٣ الكاشـف

سائل التخفيف : أكسالات الأمونيوم ١٪ في الماء المقطر . يذاب (١) غ من أكسالات الأمونيوم في الماء المقطر ويخفَّف إلى ١٠٠ مل . اخزنه في الثلاجة (البرّاد) ، ورشِّحه دائماً قبل الاستعمال .

٣–٨–٤ النمـوذج

دم وريدي مع الايديتات أو دم شعيري .

إذا كانت عينة الدم من وخزة إصبع ، فيجب أن تكون الوخزة نظيفة والدم ينساب بطلاقة . تمسح قطرة الدم الأولى . وإذا كانت العيّنة من دم وريدي ، فيجب أخذها في زراقة بلاستيكية جافة

(أو زجاجية مبطنة بالسيليكون) بإبرة قصيرة عيار ١٩ أو ٢٠ . ويجب نزع الإبرة قبل وضع الدم في الوعاء البلاستيكي المحتوي على الإيديتات . ويجب دون تأخير مزج الدم ومضاد التخثر برفق لتجنب الرغوة .

٣-٨-٥ طريقة العمل

١ - ضع بممص : ٠,٣٨ مل من سائل التخفيف في أنبوب اختبار .
٢ - املأ الممص الحجمي الذي سعته ٢٠ مكل إلى العلامة بالدم ثم امسح الممص من الخارج .
٣ - أفرغ محتويات الممص في سائل التخفيف واغسله بسحب السائل ومَجّه في الأنبوب عدّة مرات . امزج لمدة ١٠ دقائق على الأقل باليد أو بخلاط آلي ، وهو الأفضل .
٤ - حضّر معداد الكريات مع جعل ساترته في موضعها المناسب (انظر القسم ٣-٦-٩) . وخذ بممص باستور أو بأنبوب شعري قدراً من الدم المخفف واملأ جانبي معداد الكريات كليهما .
٥ - استر الحجيرة بطبق بتري Petri dish لمدة ١٠-٢٠ دقيقة تمكّن الصفيحات من الاستقرار . اترك قطعة قطن أو ورقة ترشيح مبلّلة في الطبق لمنع التبخر .
٦ - حرّك مكثفة المجهر إلى الأسفل للحصول على شدة ضوء منخفضة ، أو استعمل مجهراً متباين الصفحات . عد الصفيحات في المربعات الكبيرة بمساحة ١ مم٢ = ٠,١ مكل . عدُّ الصفيحات في العدد اللازم من المربعات للوصول إلى ١٠٠ صفيحة . تظهر الصفيحات مستديرة أو بيضوية . وتمكّن بنيتها الداخلية الحبيبية ولمعانها الارجواني من تمييزها عن الحطام . وتُرى في الخلفية أشباح الكريات الحمراء التي انحلت بأكسالات الأمونيوم .

٣-٨-٦ الحسابات

احسب عدد الصفيحات باللتر من الدم بحسب الصيغة الآتية :

التعداد (صفيحات/لتر) = ع × $\frac{\text{ت}}{\text{م}}$ × ١٠ × ١٠٦

حيث: ع = العدد الاجمالي للصفيحات المعدودة
ت = عامل التخفيف
م = اجمالي المساحة المعدودة (مم٢)
١٠ = عامل لتحويل المساحة إلى حجم بالمكرولتر
١٠٦ = معامل لتحويل التعداد/مكل إلى تعداد/ل

٣-٨-٧ مصادر الخطأ

١ - يفضل الدم المأخوذ بالبزل الوريدي على الدم الشعيري ، لأن الصفيحات تلتصق بالجرح ، والتخفيفات المتوالية من وخزة الاصبع لا تعطي دائماً نتائج متماثلة .

٢ – يوجد وصف للأخطاء العامة في استعمال الممصات وقياس تعداد الكريات الدموية تحت عنوان التركيز العددي للكريات البيضاء (تعداد الكريات البيضاء) . وفضلاً عن ذلك يجب بذل عناية خاصة لضمان كون حجيرة العد نظيفة تماماً ، حيث أن الحطام قد يُعَدّ كصفيحات . اغسلها بماء صابوني ثم اشطفها بماء مقطر ودعها تُستَنْضب حتى تجف . ثم امسحها بنسيج خالٍ من النسالة lint-free . تأكد أن الساترة نظيفة قبل استعمالها .

٣ – وجود لزنات من الصفيحات يؤدي إلى تعدادات لا يعوّل عليها . واذا كانت العيّنة تحتوي على لزنات ، فيجب أخذ عينة جديدة .

٤ – يجب حفظ مخفِّف أكسالات الأمونيوم في الثلاجة (البرّاد) وينبغي طرحه اذا وجدت بيِّنة على تلوث جرثومي فيه .

٥ – يجب عدّ النموذج خلال ٣ ساعات من أخذه .

٣–٨–٨ تضبيط الجودة

١ – يجب عمل تخفيفين ويؤخذ متوسط التعدادين . ويجب أن لا يزيد الفرق بين التعدادين عن ١٠٪ .

٢ – يجب أن يتماشى تعداد الصفيحات على الحجيرة مع الصفيحات المرئية في اللطاخة .

٣–٨–٩ القيم المرجعية

٢٥٠ – ٥٠٠ × ١٠^٩/ل

٣–٩ سرعة تثفل الكريات الحمراء . الطريقة : ويسترغرين

٣–٩–١ المبدأ

تقيس سرعة تثفل sedimentation rate الكريات الحمراء تثفلها في بلازماها الأصلية . ويتم الحصول على القيمة العددية بالمليمترات بقياس المسافة بين أدنى نقطة من هلالة السطح surface meniscus والحد الأعلى لثفالة الكريات الحمراء في عمود من الدم المعامل بمضاد للتخثر والمخفّف وذلك بعد تركه واقفاً في الأنبوب المنتقى لمدة ٦٠ دقيقة . والطريقة الموصوفة ، المبنية على طريقة ويسترغرين Westergren ، هي طريقة روتينية منتقاة حسب توصيات اللجنة الدولية للتقييس في علم الدمويات (ICSH) .

٣–٩–٢ الأجهزة والكيماويات

– أنابيب ويسترغرين مطابقة لمعايير اللجنة الدولية للتقييس في علم الدمويات
– ماسك لأنبوب التثفل
– سترات ثلاثية الصوديوم ، ثنائية الهيدرات dihydrate

٣-٩-٣ الكاشف

محلول السترات الثلاثية الصوديوم الثنائية الهيدرات : مضاد للتخثر ومخفِّف :

سترات ثلاثية الصوديوم ثنائية الهيدرات	٨,٠ غ
ماء مقطر	حتى ٢٥٠ مل

يحفظ في الثلاجة (البرّاد) ويحضر محلول طازج كل أسبوع . ويطرح قبل مضيّ الأسبوع إذا صار عكراً turbid .

٣-٩-٤ النموذج

دم وريدي : ٤ أحجام من الدم تضاف الى حجم من الكاشف المضاد التخثر والمخفِّف . والبديل لذلك ، دم ممنوع تخثره بالإيديتات الصلبة (١,٥ مغ/مل) ، ولكن يجب تخفيفه بمعدل ٤ أحجام من الدم مع حجم من الكاشف المضاد التخثر والمخفِّف قبل إجراء الاختبار مباشرة .

٣-٩-٥ طريقة العمل

١ - يُملأ أنبوب ويسترغرين معياري نظيف وجاف بالدم ويحكم المستوى على العلامة « صفر » .

٢ - ثم يوضع الأنبوب في وضع عمودي تماماً في ماسك الأنابيب دون تعريضه لضوء الشمس المباشر وفي منأى عن الاهتزازات والتيارات .

٣ - بعد ساعة تماماً ، تُقرأ المسافة بين أسفل هلالة السطح الى أعلى عمود الكريات الحمراء المتثفلة (حيث تظهر الكثافة الكاملة) بالميليمتر وتسجل كقيمة سرعة تثفّل الكريات الحمراء . مثلاً : سرعة تثفل الكريات الحمراء = ٢٦ مم بالساعة .

٣-٩-٦ مصادر الخطأ

١ - إذا حفظ النموذج في درجة حرارة الغرفة فيجب إجراء الاختبار في خلال ساعتين من أخذه ، وإذا حفظ في درجة حرارة ٤° س ففي خلال ٦ ساعات . ويمكن استعمال الدم في الإيديتات EDTA حتى ٢٤ ساعة من أخذه إذا حُفِظ في درجة ٤°س .

٢ - تعتمد سرعة تثفل الكريات الحمر على درجة حرارة الغرفة التي يُجرَى فيها الاختبار . والأرقام السوية التي تُذكر عادة ترتبط بدرجة حرارة ١٨ - ٢٥° س . فاذا كانت درجة الحرارة أعلى من ذلك فيجب تعيين مجال سوي مختلف .

٣ - يجب تجنب التلوث بمواد تنظيف الجلد أثناء بزل الوريد .

٤ - إن أي جلطات في الدم تفقد الاختبار قيمته .

٥ – لا يجوز استعمال حجم نسبي خاطىء بين السترات والدم . ولذلك يجب بذل عناية تامة في التخفيف والمزج .
٦ – لا يجوز استعمال أنبوب ويُسترغرين قذر .
٧ – إذا كان وضع الأنبوب غير عمودي تنخفض سرعة التثفل انخفاضاً كاذباً .
٨ – لا يجوز استعمال كاشف فاسد (عكر) .
٩ – لا يجوز وجود فقاقيع في عمود الدم .
١٠– التوقيت غير الدقيق يؤدي الى اختبار خاطىء . يجب تحديد الوقت بساعة واحدة بالضبط .

٣–٩–٧ تضبيط الجودة

ما من وسيلة سوى اتباع طريقة عمل جيدة .

٣–٩–٨ القيم المرجعية

قد تكون القيم العادية واسعة جداً ويجب تحديدها بمعرفة الخدمة المخبرية المحلية . وفي المناخات المعتدلة تكون المجالات التي تشمل ٩٥٪ من السكان :

الرجال : ١ – ١٠ مم/ساعة
النساء : ٣ – ١٤ مم/ساعة

٣–١٠ اختبار الخلايا المنجلية . الطريقة : الاختزال بالميتابيسلفيت

٣–١٠–١ المبدأ

تحت توتر اكسجين منخفض ، تأخذ الكريات الحمراء التي تحتوي على الهيموغلوبين المنجلي (س) الشكل المنجلي sickle shape المميَّز . والميتابيسلفيت metabisulfite يخفّض توتّر الأكسجين . ولذلك فعندما يضاف محلول ميتابيسلفيت إلى دم كامل ثم يختم على هذا المزيج تحت الزجاج ليمكن رؤيته بمجهر في فواصل زمنية متعدّدة ، فإن الكريات الحمراء المحتوية على الهيموغلوبين س سوف تتمنجل .

٣–١٠–٢ الأجهزة والكيماويات

- مجهر
- شرائح مجهرية وسواتر وزيت للغطس
- ممص باستور
- عود مطباق
- ميتابيسلفيت الصوديوم
- هلال البترول أو فازلين

٣-١٠-٣ الكواشف

كاشف ميتابيسلفيت الصوديوم : حديث التحضير :

مسحوق ميتابيسلفيت الصوديوم	٢ غ
ماء مقطر	١٠٠ مل

٣-١٠-٤ طريقة العمل

١ – ضع بمص باستور قطرتين من كاشف الميتابيسلفيت في وسط شريحة مجهرية .
٢ – اغمس العود في الدم وانقل كمية صغيرة جداً من الدم إلى كاشف الميتابيسلفيت على الشريحة . امزج مزجاً متجانساً .
٣ – ضع بواسطة العود فلماً رقيقاً من الفازلين على حوافي ساترة . ضع الساترة فوق الخليط على الشريحة .
٤ – باستعمال العدسة الشيئية الكبيرة للمجهر ، افحص الشريحة فوراً . ابحث عن باحة رقيقة (حيث الكريات لا يلامسن بعضها بعضاً) . افحص بعد ١٥ و ٦٠ دقيقة واذا كانت النتيجة لا تزال سلبية افحص بعد ٢٤ ساعة .

٣-١٠-٥ النتائج

الكريات الحمراء المحتوية على الهيموغلوبين س شكلها كشكل المنجل . وهذا الشكل يجب أن يكون له على الأقل بروزان مؤنفان قد يمتدان ليصبحا خيطين . ويعتمد قدر التمنجل والوقت اللازم لظهوره على كمية الهيموغلوبين س الموجودة . وفي غالبية حالات الخَلّة المنجلية sickle cell trait يظهر التمنجل خلال ساعة واحدة ، ولا يمكن التفريق بين فقر الدم المنجلي والخَلّة المنجلية على أساس هذا الاختبار .

٣-١٠-٦ مصادر الخطأ

١ – قد يكون الكاشف المحضّر في غير يوم استعماله عاطلاً غير فعال inactive .
٢ – تركيزات خاطئة للكاشف : فمحلول الكاشف المفرط التوتر قد يسبب تَفَرُّض crenation الكريات الحمراء الذي قد يُظن خطأً أنه تمنجل ، ومحلول الكاشف الناقص التوتر قد يسبب تكوين كريات حمراء كروية ويؤدي إلى نتائج سلبية كاذبة .
٣ – تجفيف المستحضر قبل الفحص .
٤ – عدم التريّث بما فيه الكفاية ، مثلاً حتى ٢٤ ساعة ، قبل اعتبار الاختبار سلبياً للتمنجل .
٥ – اجراء الفحص بعد نقل دم حديث يعطي نتائج لا يعوّل عليها .
٦ – قد تحدث نتائج سلبية كاذبة مع نماذج من دم الحبل السري cord blood ونماذج تحتوي على نسبة منخفضة من الهيموغلوبين س ، وهي خاصية بعض الخلايا المنجلية .

٣-١٠-٧ تضبيط الجودة

يجب اجراء الاختبار في نفس الوقت على عينة معروفة بشذوذها إذ تحوي الهيموغلوبين س ، وعينة معروف أنها طبيعية . ويجب أخذ هذه العينات الشاهدة السوية والشاذة من أفراد يقاربون في العمر صاحب نموذج الاختبار .

٣-١١ الكسر العددي للكريات الشبكية (تعداد الكريات الشبكية)

٣-١١-١ المبـدأ

الكريات الشبكية reticulocytes هي كريات حمراء فتية غير منوّاة ولاتزال تحتوي على بقايا الرنا RNA (الحمض النووي الريبي) في الهيولى cytoplasm . وعندما يتم تلوينها بزرقة المتيلين الجديدة أو زرقة الكريزيل اللامعة brilliant cresyl blue ، فان الرنا يترسب على شكل خيوط وحبيبات مزرقّة داخل الخلية الحمراء . وتستعمل طريقة العمل نفسها لإظهار أجسام هاينز Heinz bodies أيضاً .

٣-١١-٢ الأجهزة والكيماويات

- مجهر
- شرائح زجاجية ٢٥ × ٧٥ مم
- ممصات باستور
- أنابيب ١٢ × ٧٥ مم
- زرقة المثيلين الجديدة C.I. 52030
- زرقة الكريزيل اللامعة C.I. 51010
- أكسالات البوتاسيوم
- سترات ثلاثية الصوديوم ، ثنائية الهدرات

٣-١١-٣ الكاشـف

يمكن استعمال زرقة المتيلين الجديدة أو زرقة الكريزيل اللامعة . وزرقة المتيلين الجديدة هي الملوِّن المفضل .

كاشف زرقة المتيلين الجديدة :

زرقة المتيلين الجديدة	٠,٥ غ
أكسالات البوتاسيوم	١,٦ غ
ماء مقطر	١٠٠

ملاحظة : رشّح الكاشف قبل الاستعمال

كاشف زرقة الكريزيل اللامعة :

زرقة الكريزيل اللامعة (C.I. 51010)	١,٠ غ
سترات ثلاثية الصوديوم ، ثنائية الهيدرات	٠,٤ غ
محلول كلوريد الصوديوم ٨,٥ غ/لتر (٠,٨٥ ٪)	١٠٠ مل

ذوّب الملّون والسترات معاً في محلول كلوريد الصوديوم . رشّح المحلول .

٣-١١-٤ النموذج

دم وريدي مع الإيديتات أو دم شعيري .

٣-١١-٥ طريقة العمل

١ – أضِفْ ، بمص باستور كميتين متساويتين من الدم وكاشف زرقة المتيلين الجديدة **أو** كاشف زرقة الكريزيل اللامعة (٣ قطرات و ٣ قطرات) في أنبوب ١٢ × ٧٥ مم وامزج . لا حرج من عدم الدقة البالغة في التخفيف الناتج .

٢ – اترك المزيج في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق .

٣ – امزج مرّة ثانية ثم انقل قطرة صغيرة من المزيج إلى شريحة واضع فلماً . دع الفلم يجف في الهواء .

٤ – باستعمال الغاطسة الزيتية oil immersion عدّ ١٠٠٠ كرية حمراء ولاحظ عدد الكريات الشبكية التي تجدها فيها .

٣-١١-٦ الحساب

يمكن التعبير عن عدد الكريات الشبكية بكسر عددي أو بنسبة مئوية من الكريات الحمراء .

الكسر العددي للكريات الشبكية = عدد الكريات الشبكية التي وجدت في ١٠٠٠ كرية حمراء × ١٠$^{-٣}$

$$\text{النسبة المئوية (٪) للكريات الشبكية} = \frac{\text{عدد الكريات الشبكية المعدودة}}{\text{عدد الكريات الحمراء}} \times ١٠٠$$

وللتعديل الخاص بفقر الدم ، اضرب عدد الكريات الشبكية المعدودة ب :

$$\frac{\text{هيموغلوبين (غ/ل)}}{١٥٠} \quad \text{أو} \quad \frac{\text{الكسر الحجمي للكريات الحمر}}{٠,٤٥}$$

٣-١١-٧ مصادر الخطأ

١ – الالتباس الحاصل من الخلط بين الكريات الشبكية من جهة وأجسام هاينز Heinz والكريات الحديدية siderocytes وجسيمات من الملون المترسب من جهة أخرى .

٢ – إجراء العد في مساحات من اللطاخة لا تكون فيها الكريات الحمراء موزعة بانسجام . يجب أن لا يوجد تراكب أو تلازن في الباحات التي يجري فيها العدّ .
٣ – استعمال دم غير كافٍ بالنسبة إلى الملون في حالة النماذج من مرضى بفقر الدم . في مثل هذه الحالات تضاف ٦ قطرات من الدم الى ٣ قطرات من الملوِّن .
٤ – استئصال الطحال splenectomy الذي يؤدي إلى وجود مشتملات أخرى في الكريات الحمراء قد تحسب خطأً كريات شبكية .

٣-١١-٨ تضبيط الجودة

جمع نماذج الدم السوي تحتوي على بعض الكريات الشبكية . ولهذا يجب أن يضم فلم دم سوي ويجب فحصه للتحقق من كون الكريات الشبكية قد تلوّنت . واذا أمكن الحصول على فلم فيه تعداد مرتفع من الكريات الشبكية (مثلاً : فلم من مريض بفقر الدم الانحلالي) فيجب ضمّه أيضاً .

٣-١١-٩ القيم المرجعية

الرضّع عند الولادة : ٢٠-٦٠ × ١٠$^{-٣}$ أو ٢-٦ ٪ .

الأطفال والبالغون : ٢-٢٠ × ١٠$^{-٣}$ أو ٠,٢-٢٪ .

٣-١٢ زمن النزف

يقاس زمن النزف bleeding time بتحديد الوقت اللازم لتوقف النزف من أوعية تحت الجلد صغيرة ، جرى قطعها بشق معياري . وإحدى المشاكل الرئيسية التي نُواجِهُها عند إجراء تعيين زمن النزف هو امكانية التناتج reproducibility أي الحصول على نفس النتيجة في كل مرة . وأقدم الطرائق هي طريقة ديوك Duke ، التي تُجرى بوخز شحمة الأذن بواخزة . وعيب هذه الطريقة هو استحالة تعيير عمق الشق . وقد ابتُكِرَت طريقة آيفي Ivy لتحل محل طريقة ديوك ، وهي أكثر تعييراً .

ومدة زمن النزف هي قياس لسلامة الأوعية والصفيحات . فالصفيحات تلتصق بالكولاجين المعرض (تحت البطانة subendothelial) وبصورة لاحقة بعضها ببعض لتشكّل كداسة aggregate تسدّ الجرح .

٣-١٢(أ) زمن النزف . طريقة ديوك

٣-١٢(أ)-١ الأجهزة والكيماويات

- واخزة معقمة
- قطن طبي أو رفائد شاش

- كحول ٧٠٪ أو مطهر مناسب آخر
- ورق ترشيح دائري
- ميقاتية timer أو ميقافية stopwatch أو ساعة بعقرب ثواني .

٣-١٢-(أ)-٢ طريقة العمل

١ - نظّف برفق شحمة أذن المريض برفادة كحول ، لا تفركها .
٢ - دع الكحول يجف .
٣ - قم بوخز شحمة الاذن في جزئها الأسفل بعمق حوالي ٣ مم .
٤ - شغِّل الميقافية stopwatch فوراً ، أو لاحظ وضع عقرب الثواني في ساعة عادية بعد اجراء الوخز . يجب أن يكون الجرح عميقاً بدرجة تسمح بانسياب الدم بطلاقة دون عصر .
٥ - بعد ٣٠ ثانية - خذ قطرة الدم الأولى على حافة ورقة الترشيح . لا تلمس الجلد بالورقة .
٦ - انتظر ٣٠ ثانية أخرى ثم خذ القطرة الثانية بنفس الطريقة في موضع آخر من حافة ورقة الترشيح .
٧ - تابع جمع قطرة من الدم كل ٣٠ ثانية .
٨ - وعندما يتوقف ظهور الدم تماماً ، أوقف الميقافية أو لاحظ الوقت على الساعة .
٩ - الفاصلة الزمنية بين الوخزة وبين توقف النزف هي زمن النزف .

٣-١٢(أ)-٣ التقـرير

- سجِّل زمن النزف إلى أقرب نصف دقيقة .
- أذكر أيضاً المجال السوي للطريقة المستخدمة ، مثلاً : المجال السوي لطريقة ديوك : ١-٥ دقائق .

٣-١٢-(أ)-٤ مناقشـة

١ - يُجرى هذا الاختبار لتشخيص بعض الاضطرابات النزفية ، وقبل العمليات الجراحية للكشف عن أي ميل شاذ للنزف .
٢ - لكي يكون لهذا الاختبار أهمية تشخيصية ، يلزَم دائماً إجراء جرح معياري .
٣ - تشمل العوامل الأخرى التي تؤثر على الأداء الصحيح لزمن النزف درجة حرارة الجلد والمنطقة الموخوزة ، وثخانة الجلد ، ودوران الدم .
٤ - وحيث أن شحمة أذن الرضيع بالغة الرقة لا تصلح لعمل وخزة كافية ، فيجب في الرضّع استخدام العقب لتعيين زمن النزف .

٣-١٢(أ)-٥ مصـادر الخطأ

١ - عصر شحمة الأذن
٢ - وخز بطريقة خاطئة
٣ - درجة حرارة الجلد منخفضة
٤ - استعمال إبرة للوخز بدلاً من الواخزة .
٥ - عمق الجرح غير ملائم

٣-١٢(ب) زمن النزف : طريقة آيفي

٣-١٢(ب)-١ الأجهزة والكيماويات

- مقياس ضغط الدم
- ساعة ميقافية stopwatch (يفضل وجود ثلاث ميقافيات) .
- ورق ترشيح دائري
- كحول ٧٠٪ أو مطهر مناسب آخر
- قطن طبي أو شاش
- واخزات وحيدة الاستعمال (بشفرات مدببة بطول ٢ مم ولها مناكب ، مثلاً مبضع الدم رقم ٤٣٣ من بكتون وديكنسون) .
- عصائب معقمة .

٣-١٢(ب)-٢ طريقة العمل

١ - ثبّت كُفّة مقياس ضغط الدم manometer cuff حول العضد ، ونظّف الساعد برفق برفادة كحول ، ودعه يجف .
٢ - انفخ الكُفة إلى ٤٠ مم زئبق وانتظر ٣٠ ثانية لتتيح لدم الشعيرات أن يتوازن .
٣ - اعمل ثلاثة جروح بالواخزة على الساعد ، ويفضل أن تكون على الجانب الأمامي حيث لا يوجد شعر . تجنّبْ الأوردة السطحية .
٤ - شغِّل ميقافية لكل جرح وخزي puncture wound عندما يبدأ النزف ، ويبدأ النزف بصفة عامة خلال ١٥-٣٠ ثانية .
٥ - إذا لم يبدأ النزف خلال ٣٠ ثانية ، يمكن توسيع الجروح قليلاً بين إصبعين (هذا لا يغير نتيجة الاختبار) .
٦ - نشِّف الدم برفق بورقة الترشيح الدائرية بفواصل ١٥ ثانية ، وحاول تجنّب التماس المباشر بين ورقة الترشيح وبين الجرح .

٧ – يتم الوصول إلى نقطة النهاية عندما لا يلوِّن الدم ورقة الترشيح . سجل الوقت عند هذه النقطة لكل جرح وخزي .
٨ – فُشّ كُفّة مقياس الضغط وانزعها .
٩ – خذ متوسط أزمنة النزف من الجروح الوخزية الثلاثة .
١٠– نظِّفْ مواقع الوخز وضع عصابة معقمة .

٣-١٢(ب)-٣ النتائج

المجال السوي : ٢–٧ دقائق

٣-١٢(ب)-٤ مصادر الخطأ

١ – لا يحدث نزف بسبب وخزة خفيفة جداً .
٢ – نزف شديد : يرجّح أن يكون قد قُطع وريد سطحي .
٣ – إذا لمست ورقة الترشيح الجرح ، فقد تنزع كداسة الصفيحات ، مما يؤدي إلى نزف مديد .

٣-١٣ أفلام النقي (مخ العظم) bone marrow . التلوين والفحص

٣-١٣-١ المبـدأ

يمكن الحصول على نماذج النقي بالشفط aspiration الذي يقوم به في الظروف العادية طبيب . وتفحص أشكال الخلايا في أفلام ملوّنة بطريقة ورمانوفسكي وكذلك بالتلوين الخاص من أجل الحديد لدراسة المحتوى من الحديد وتوصف هذه الطريقة الأخيرة منفصلة .

٣-١٣-٢ الأجهـزة والكيماويات

- مجهـر
- شرائح مجرية
- سواتر
- ممص باستور
- فارشة
- رفرف أو مرطبان للتلوين
- زيت الغطس

٣-١٣-٣ الكواشـف

- كحول متيلي مطلق
- ملوِّن غيمزا . انظر القسم ٣-٤-٢ لتحضير هذا الملون

٣-١٣-٤ التحضير والتلوين

١ - يجب أن يصحب التقني المخبري الطبيب عندما يقوم بشفط النقي ، لأنه يجب عمل الأفلام فوراً قبل أن يبدأ تجلط النموذج .

٢ - ضع قطرة صغيرة من النقي المشفوط على احدى نهايتي كل شريحة من الشرائح الزجاجية . ومصّ الدم الزائد فوراً بممص باستور ، تاركاً الجسيمات النقوية . افرش مادة النقي كما هو الحال في لطاخة الدم .

٣ - جفف الأفلام في الهواء . ثبّتها في الكحول المثيلي ، ولوّن بعض الأفلام بملوّن رومانوفسكي ، واحتفظ بفلم واحد على الأقل فيه جسيمات نقوية للتلوين من أجل الحديد . استر الأفلام الملوَّنة بسواتر ، مستعملاً مرسّيا mountant متعادلاً أو قطرة من زيت الغطس .

٣-١٣-٥ الفحــص

افحص الأفلام بالعين المجردة لاكتشاف الجسيمات النقوية التي تظهر على الفلم على شكل باحات قاتمة التلوّن غير منتظمة الشكل على نقيض تلوّن باقي اللطاخة المنتظم القرنفلي أو البنفسجي . قم بالمبادرة على المنطقة المجاورة مباشرة للباحات القاتمة حيث يمكن تقدير خلوية cellularity نقي العظم بسهولة . ويجب فحص فلم النقي بأكمله بالتكبير الأصغر ، مثلاً × ١٠٠ ، فذلك يمكّن الفاحص من تقدير العلاقة الكميّة بين النسيج الدهني وبين الخلايا بالمكوِّنة للدم haemopoietic وبين عدد النوّاءات megakaryocytes وبين الخلايا البلازمية plasma cells والخلايا البدنية mast cells . ويسمح هذا التكبير أيضاً باكتشاف الخلايا العملاقة (بانيات العظم osteoblasts وناقصات العظم osteoclasts ، وكذا الخلايا الخبيثة ، والجريبات اللمفية lymph follicles والحبيبومات granulomata) . ويجب فحص الفلم بأكمله ولا يستعمل التكبير الأعلى إلا بعد اختيار مساحة ممثلة لمجمل اللطاخة من أجل الدراسة التفصيلية والعد التفريقي . والباحة المثالية للغرض الأخير هي تلك التي تؤلف الخلايا المكونة للدم فيها طبقة وحيدة الخلايا monocellular وتكون الكريات الحمراء الموجودة قرنفلية التلوّن .

وفي دليل مختبرات مراكز مكافحة المرض [1] صـور مجهـرية ملونة تساعد على تفسير أفلام النقي (مخ العظم) .

٣-١٤ أفلام النقي . محتوى الحديد

٣-١٤-١ المبـدأ

يمكن باستعمال ملون خلوي كيميائي إظهار كمية الحديد القابلة للتلوين في النقي وتقديرها كمياً . ولهذا أهمية خاصة في تشخيص عوز الحديد والتلاسيمية البائية ß-thalassaemia وفقر الدم الأرومي الحديدي sideroblastic .

ويقوم الاختبار على تفاعل زرقة بروسيا Prussian-blue reaction (تفاعل بيرلس Perls' reaction) . يتفاعل الحديد الأيوني مع محلول الفيروسيانيد الحمضي ليعطي لوناً أزرق .

٣-١٤-٢ الأجهزة والكيماويات

- مجهر
- رفرف أو مرطبان للتلوين
- سواتر
- زيت الغطس
- حمض الكلوريدريك ، مركّز (٣٧٪ وزن/حجم) . تحذير : أكّال قوي
- فيروسيانيد البوتاسيوم
- فوكسين قاعدي (باراروزانيلين ، C.I. 42500) أو يوزين (C.I. 45800) .
- ايثانول ، مطلق

٣-١٤-٣ الكواشف

١ - حمض الكلوريدريك ٠,٢ مول/لتر : تُصَبّ ٢ مل حمض الكلوريدريك المركّز بعناية في ٩٨ مل ماء مقطر بارد ، مع التحريك المستمر . هذا المحلول ثابت عدة أشهر في درجة حرارة الغرفة .

٢ - فيروسيانيد ferrocyanide البوتاسيوم في الماء المقطر ٢٠ غ/لتر . هذا المحلول أيضاً ثابت عدة أشهر في درجة حرارة الغرفة .

٣ - محلول الفوكسين القاعدي basic fuchsin أو اليوزين eosin : يذاب ١ غ من الفوكسين القاعدي أو اليوزين إلى ١٠٠ مل ماء مقطر . وهذا ثابت بضعة أسابيع في درجة حرارة الغرفة .

٣-١٤-٤ طريقة العمل

١ - اختر من بين لطاخات النقي المثبتة بالميثانول (انظر ٣-١٤-١) واحدة تحتوي على جسيمات نقوية .

٢ - امزج حجمين متساويين من حمض الكلوريدريك ٠,٢ مول/ل ومحلول فيروسيانيد البوتاسيوم (٢٠ غ/ل) في مرطبان تلوين . ضع الشريحة في هذا المزيج في درجة حرارة الغرفة مدة ١٠ دقائق ، ثم اغسلها جيداً بماء الحنفية مدة ٢٠ دقيقة ولوِّنها بملوّن مباين بمحلول مخفف من الفوكسين القاعدي أو اليوزين مدة ٥ دقائق ثم اشطفها جيداً بماء الحنفية ثم ضعها في كحول ايثيلي مطلق لمدة دقيقتين ثم اشطفها أخيراً بماء الحنفية مرة أخرى . وبعد أن تجف اللطاخات في الهواء ، تكون جاهزة للفحص .

٣-١٤-٥ التفسير

تظهر حبيبات الحديد بشكل كداسات زرقاء أو زرقاء مخضرّة زاهية على نقيض الخلفية الملّونة بالقرنفلي . وتظهر هذه الحبيبات التي لا تتعدى أقطارها عادة ١ مكم بأعداد متباينة ، في هيولى طلائع الكريات الحمر erythroid precursors المنوّاة أو غير المنواة (تسمى الأولى الأرومات الحديدية والثانية الكريات الحديدية) . وعندما تحيط الحبيبات بالنوى فانها تكوّن ما يسمى الأرومات الحديدية المتحلقة ringed . وكثيراً ما يمكن أيضاً رؤية حبيبات الحديد في الخلايا الشبكية البطانية reticuloendothelial cells للنقي ، وقد تكون كروية أو غير منتظمة الشكل .

وهكذا يتمكن المرء بفحص جيد للحديد في الخلايا الشبكية البطانية ، من أن يقدّر بدقة مخزون الجسم من الحديد . كذلك يمكنه بفحص طلائع الكريات الحمراء بالغاطسة الزيتية أن يصل إلى تقدير كمي وكيفي للحديد في أرومات الحمراء السوية normoblasts . وفي الحالات السوية تُظهر ٢٥٪ الى ٥٠٪ من أرومات الحمراء السوية ١-٤ حبيبات حديدية صغيرة . وفي حالات عوز الحديد لا توجد عملياً أية حبيبات ويُظهر المرضى الذين لديهم شذوذ في تخليق الهيم haeme ، زيادة واضحة في حبيبات الحديد ، وعندما توجد مشاكل تخليقية متقدرية mitochondrial (فقر الدم الحديدي الأرومات) ، تشاهد كثرة من الأرومات الحديدية « المتحلّقة » . والمرضى المصابون بعيوب تخليق هيولية (أي التالاسيمية) يبدون زيادة في عدد الحبيبات الحديدية الكبيرة البارزة ، متناثرة في أنحاء الهيولى .

ويحدث فرط الحديد في الخلايا الشبكية البطانية عندما يوجد تخريب في الخلايا الحمرانية في النقي (كما في فقر الدم بخلل تكوّن الحمر) وفي فقر الدم التالي للالتهاب .

٣-١٤-٦ المراجع

التفاصيل الكاملة موجودة في دليل مختبرات/مراكز مكافحة الأمراض [1] .

٣-١٥ زمن البروثرمبين : طريقة المرحلة الواحدة

٣-١٥-١ المبدأ

زمن البروثرمبين هو الزمن اللازم لتخثر المصورة بعد إضافة ثرمبوبلاستين نسيجي وكمية مثلى من كلوريد الكالسيوم .

٣-١٥-٢ الأجهزة والكيماويات

- حمام مائي ، ذو ناظم حرارة مضبوط على درجة ٣٧°س ، وحمّالة أنابيب . ويفضل أن يكون الحمام المائي مصنوعاً من الزجاج أو البيرسبيكس perspex . إذ يمكن عندئذ إبقاء الأنبوب في الحمام المائي عند اجراء الاختبار .

- صنارة سلكية . مقبض مع صنارة معدنية مصنوعة من مشبك الورق ، يمكن تحريكها إلى أعلى وأسفل في أنبوب الاختبار .
- أنابيب اختبار ، أنابيب زجاجية مستديرة القاع تناسب حمالة الأنابيب .
- ساعة ميقافية stopwatch .
- سترات ثلاثية الصوديوم ، ثنائية الهدرات .
- كلوريد الكالسيوم ، اللامائي (قد يكون من الأنسب شراء محلول جاهز بسبب الطبيعة المسترطبة hygroscopic لهذه المادة الكيميائية) .

٣-١٥-٣ الكواشف

١ - السترات الثلاثية الصوديوم ، ٠,١١ مول/ل : ذوّب ٣٢ غ من السترات الثلاثية الصوديوم الثنائية الهدرات في ماء مقطر أو منزوع الشوارد deionized ، وأكمل الحجم إلى اللتر في حوجلة حجمية .

٢ - كاشف الثرمبوبلاستين ، وهذا يمكن أن يكون من مصدر تجاري أو يحضَّر في المختبر الوطني المركزي .

٣ - محلول كلوريد الكالسيوم ٠,٠٢٥ مول/ل : ذوّب ٢,٧٧ غ من كلوريد الكالسيوم اللامائي ($CaCl_2$) في لتر ماء مقطر ، أو خفف المحلول التجاري بحسب اللزوم . وفي بعض الكواشف التجارية يوجد هذا المحلول مضافاً سلفاً إلى الثرومبوبلاستين .

٣-١٥-٤ طريقة العمل للكاشف التجاري ثرمبوبلاستين - كالسيوم

١ - أضف دماً وريدياً إلى محلول سترات الصوديوم (٠,١ مول/ل) بنسبة ٩ أجزاء من الدم إلى جزء من السترات . نَبِّذْ الدم الممزوج بالسترات بسرعة ٣٠٠ دورة في الدقيقة (١٦٠٠ قوة جاذبية) لمدة ١٥ دقيقة ، للحصول على بلازما فقيرة بالصفيحات .

٢ - احضن البلازما في درجة حرارة ٣٧° س لمدة ٥ دقائق . ثم أضف ٠,١ مل من بلازما سبقت تدفئتها إلى أنبوب اختبار يحتوي على ٠,٢ مل من ثرمبوبلاستين سبقت تدفئته . شغّل الميقافية .

٣ - سجّل الزمن اللازم لتشكّل الجلطة بتحريك الصنارة السلكية إلى أعلى وأسفل كل ثانية إلى أن تلاحظ تشكّل الجلطة .

٤ - عند إجراء اختبارات مزدوجة ، يجب أن يكون الاختلاف بين المعادات duplicates في جميع العينات أقل من ٥٪ من زمن البروثرمبين .

٣-١٥-٥ طريقة العمل للترمبوبلاستين بدون كالسيوم المحضَّر محلياً أو تجارياً

١ - قم بتحضير البلازما كما في ٣-١٥-٤-١ أعلاه .

٢ – احضنها في أنبوب اختبار في درجة حرارة ٣٧° س لمدة ٥ دقائق . أضِفْ ٠,١ مل من ترمبوبلاستين سبقت تدفئته ، واحضن مدة ٣٠ ثانية .

٣ – أضِفْ ٠,١ مل من محلول سبقت تدفئته من كلوريد الكالسيوم إلى المزيج المحضون ، وامزج جيداً . شَغِّلْ الميقاتية .

٤ – سَجِّلْ الزمن اللازم لتشكل الجلطة بتحريكِ الصنارة السلكية إلى الأعلى والأسفل كل ثانية إلى أن تلاحظ تشكل الجلطة .

٥ – عند إجراء اختبارات مزدوجة يجب أن يكون الاختلاف بين المعادات duplicates في جميع العينات أقل من ٥٪ من زمن البروترمبين .

٣-١٥-٦ النتــائج

لكل وجيبة batch جديدة من الثرومبوبلاستين ، سواء أكانت محضرة تجارياً أم محلياً ، يجب تحديد القيم السوية باختبار حوالي ٢٠ شخصاً سوياً . ومن هذه النتائج يحسب المتوسط والانحراف المعياري .

٣-١٥-٧ مصــادر الخطأ

١ – بسبب ما ذكر عن كون البرودة تنشِّط العامل السابع VII في بعض البلازميات ، فإنه يجب حفظ الدم في درجة حرارة الغرفة ريثما يختبر .

٢ – اترك البلازما على الكريات والأنبوب مسدوداً حتى البدء في الاختبار ، لمنع فقدان ثاني أكسيد الكربون وحدوث تغيير في الباهاء pH .

٣ – يجب إجراء الاختبار خلال ٤ ساعات ، وإلا وَجَب تجميد البلازما بسرعة وخزنها مجمدة في أنابيب بلاستيكية .

٤ – مع أن جميع المواد المستعملة في الاختبار يجب تدفئتها إلى الدرجة ٣٧°س قبل الاستعمال فانه يجب عدم إبقاء البلازما في الدرجة ٣٧°س مدةً أطول من ١٠ دقائق وعدم إبقاء الثرمبوبلاستين في درجة ٣٧°س مدة أطول مما تحدده تعليمات الصانع .

٥ – امزج الثرمبوبلاستين جيداً قبل كل استعمال .

٦ – يجب أن تكون النسبة ٩ : ١ بين الدم وسترات الصوديوم مضبوطة تماماً .

٧ – استعمل ماءً مقطّراً أو منزوع الشوارد في استنشاء (إعادة تلوين) الكواشف .

٨ – اتبع التعليمات الواردة في الورقة المطبوعة داخل علبة الصانع .

٣-١٥-٨ تضبيط الجـودة

يعمل اختبار مزدوج على بلازما سوية طازجة في كل مرة تُجرى فيها اختبارات زمن البروثرمبين . ويسجل متوسط المعادتين والاختلاف بينهما على صحائف تضبيط الجودة . واذا كانت

نتائج الشاهد السوي خارج انحرافين معياريين عن المتوسط ، فعليك القيام بما يأتي :

١ – تحقَّقْ من أن درجة الحرارة ٣٧°س ± ١°س
٢ – تأكد أن تعيير الممصات صحيح
٣ – تحقق من مولية molarity محلول كلوريد الكلسيوم
٤ – خذ دماً من شخص سوي آخر واختبره
٥ – استنشىء قنينة vial جديدة من الثرمبوبلاستين أو ذوب أنبوباً مجمداً من الثرمبوبلاستين وأعِدْ الاختبار .
٦ – تأكدّ أن باهاء pH مزيج التفاعل حوالي ٧,٤
٧ – يجب عدم كتابة تقرير بنتائج المرضى مالم يكن متوسط الشاهد ضمن حدّى الانحرافين المعياريين المحسوبين .

٣-١٦ زمن الثرمبوبلاستين الجزئي المنشّط

٣-١٦-١ المبــدأ

يقيس زمن الثرمبوبلاستين الجزئي المنشط activated partial thromboplastin time نشاط البلازما السابق للتخثر procoagulant الداخلي المنشأ . وفي هذا الاختبار يستعمل الثرمبوبلاستين الجزئي بديلاً لعامل الصفيحات الثالث platelet factor 3 ويتم تقييس التنشيط بالتماس بإضافة منشط هو الكاولين kaolin أو السيليت celite إلى الكاشف . وهذا الاختبار لا يقيس العاملين السابع (VII)والثالث عشر (XIII) .

٣-١٦-٢ الأجهـزة والكيماويات

– حمام مائي مع ناظم حرارة وحمّالة أنابيب
– أنابيب اختبار زجاجية مستديرة القاع
– ساعة ميقافية
– صنارة سلكية . مقبض ذو صنارة معدنية مصنوع من مشبك الورق يمكن تحريكه إلى أعلى وأسفل في أنبوب الاختبار
– سترات ثلاثية الصوديوم ، ثنائية الهدرات .
– إينوزيثين inosithin – والأفضل أن يتم التزوّد به من المختبر المركزي الوطني .
– ثنائي ايثيل باربتيورات الصوديوم
– حمض الكلوريدريك ، مركزّ (٣٧٪ وزن/حجم) . **تحذير** : أكّال قوي
– كاولين (حسب دستور الأدوية)

– كلوريد الصوديوم
– كلوريد الكالسيوم

٣-١٦-٣ الكواشف

١ – السترات الثلاثية الصوديوم ، ٠,١١ مول/ل . ذوّب ٣٢ غ من السترات الثلاثية الصوديوم الثنائية الهدرات في ماء مقطر أو منزوع الشوارد ، وأكمل الحجم إلى اللتر في حوجلة حجمية .

٢ – اينوزيثين inosithin ، ٣,٨ غ/١٠٠ مل . جَنِّسْ في خلاطة ٣,٨ غ من الاينوزيثين (مثلاً من Associated Concentrates or Uniscience Ltd) في ١٠٠ من مل محلول ملحي ٠,٩٪ (انظر أدناه) . قسِّم المزيج إلى أحجام صغيرة وجمِّدها في الدرجة (– ٢٠°) س . ويمكن تسييح وإعادة تجميد هذا الكاشف بصورة متكررة . والأفضل أن يتم التزوّد به من المختبر الوطني المركزي .

٣ – محلول ملحي ، ٠,٩٪ . ذوّب ٩ غ كلوريد الصوديوم في ماء مقطر أو منزوع الشوارد وأكمل الحجم إلى اللتر .

٤ – حمض الكلوريدريك ٠,١ مول/ل . خفِّف ٩ مل حمض الكلوريدريك (المركز) بالماء المقطر إلى لتر واحد .

٥ – دارئة الباربيتون Barbitone buffer . باهاء ٧,٤ . ذوّب ١١,٧٤ غ من ثنائي ايثيل باربتيورات الصوديوم في ٤٣٠ مل من حمض الكلوريدريك المخفَّف (٠,١ مول/ل) .

٦ – المحلول الملحي المدروء بالباريثون : باهاء ٧,٤ . ذوّب ٥,٦٧ غ من كلوريد الصوديوم في لتر من دارئة الباربيتون ذات الباهاء ٧,٤ . وقبل الاستعمال مباشرة خفِّفه بحجم مماثل من محلول ملحي ٠,٩٪ .

٧ – معلق الكاولين Kaolin suspension ، ١٪ . علّق ١ غ من الكاولين في ١٠٠ مل من المحلول الملحي المدروء بالباريتون . والأفضل أن يتم التزوّد بهذا المحلول من المختبر الوطني المركزي .

٨ – محلول كلوريد الكالسيوم ، ٠,٠٢٥ مول/ل . ذوّب ٢,٧٧ غ من كلوريد الكالسيوم اللامائي في لتر من الماء المقطر أو خفّف محلولاً تجارياً (انظر ٣-١٥-٢) .

٩ – بلازما شاهدة سوية طازجة .

ملاحظة : قد تجد بعض المختبرات من الأنسب استعمال كاشف زمن الترمبوبلاستين الجزئي المنشط التجاري بدلاً من تحضير الكاشفين ٢ و ٧ أعلاه .

٣-١٦-٤ طريقة العمل

يجب إجراء الاختبار على دم وريدي طازج على معادتين لكل من المريض ولشخص سوي متبرع .

١ – حضّر كاشف زمن الترمبوبلاستين الجزئي المنشط في يوم إجراء الاختبار باضافة ٣,٤ مل من دارئة الباربيتون الى ٣,٥ مل من معلّق الكاولين و ٠,١ مل من ٣,٨٪ الاينوزيتين . وامزج جيداً .

٢ – أضف دماً وريدياً الى السترات الثلاثية الصوديوم (٠,١١ مول/ل) بنسبة ٩ أجزاء من الدم إلى واحد من السترات . نبّذ الدم السستراتي بسرعة ٣٠٠٠ دورة بالدقيقة (١٦٠٠ قوة جاذبية) لمدة ١٥ دقيقة للحصول على بلازما فقيرة بالصفيحات .

٣ – في أنبوب اختبار في درجة حرارة ٣٧°س ، أضِف ٠,١ مل من المصورة الى ٠,١ مل من كاشف زمن الثرمبوبلاستين الجزئي المنشط الممزوج جيداً . شَغّلْ الميقافية ودوّم swirlالأنبوب لإتمام المزج .

٤ – احضن في درجة حرارة ٣٧°س مدة ٤ دقائق بالضبط ، ودوّم الأنبوب مرة أخرى .

٥ – أضف ٠,١ مل من محلول سبق تسخينه من كلوريد الكالسيوم (٠,٠٢٥ مول/لتر) . دوّم الأنبوب مرة أخرى وشَغّلْ الميقافية .

٦ – سجّل الزمن اللازم لتكوين الجلطة بتحريك الصنارة السلكية إلى الأعلى والأسفل مرة كل ثانية حتى تلاحظ تشكل الجلطة .

٣-١٦-٥ مصادر الخطأ

١ – يجب إجراء الاختبارات في درجة حرارة ٣٧°س .

٢ – يفضل أن تحفظ جميع البلازميات على جليد منصهر ريثما يتم اختبارها . ويجب اختبارها خلال ساعتين من جمعها .

٣ – يجب استعمال نفس الطريقة بالضبط عند اجراء كل اختبار للحصول على نتائج دقيقة متناتجة reproducible ويؤثر زمن الحضن والباهاء ، ودرجة الحرارة ، ومقدار التنشيط بالتماس على النتائج . ويجب تدويم أنابيب الاختبار بنفس الطريقة كل مرة .

٣-١٦-٦ تضبيط الجودة

يجب إجراء معادتين لكل اختبار لكلٍ من بلازما المريض والبلازما الشاهدة . واذا كان الاختلاف بين المعادتين أكثر من ٣ ثوانٍ ، فيجب إعادة الاختبار ، ويفضل أن تكون الإعادة بعينة جديدة من المريض .

٣-١٦-٧ القيم المرجعية

يجب اختبار بلازميات شاهدة سوية طازجة من ٣٠ شخصاً لتحديد القيم السوية (لاسيما عند استعمال كاشف زمن الترمبوبلاستين الجزئي النشط المحضّر في المختبر) . ويجب أن يكون زمن الترمبوبلاستين المنشط الجزئي للمريض في حدود ١٠ ثوانٍ من الشاهد السوي (بلازما طازجة) الذي يجري اختباره في نفس الوقت .

٤ – اختبارات البلازما أو المصـل

٤–١ أخذ نماذج البلازما أو المصـل

لا يمكن أن تكون نتائج الفحوص المخبرية أحسن من نوعية النموذج التي أشتُقت منه . ومن الضروري أن تصل النماذج إلى المختبر في حالة جيدة وفي أسرع وقت ممكن .

ويجب أن تغسل أنابيب أخذ الدم للاختبارات الكيميائية السريرية غسلاً جيداً بمنظّف وتشطف جيداً بماء نظيف ثم ماء مقطر أو منزوع الشوارد قبل تجفيفها . ويجب أن تكون الزرّاقات المستعملة في أخذ الدم نظيفة وجافة . ويجب صب الدم من الزراقة بعد نزع الإبرة في أنبوب نظيف وجاف يحتوي على مضاد التخثر الملائم ، وينبغي سدّ الأنبوب بسدادة . علماً بأن سدادات القطن الطبي غير ملائمة .

يجب أن تحتوي العينات المأخوذة لتعيين الغلوكوز على الفلوريد ، منعاً لاستقلاب mltabolism الغلوكوز من قبل الكريات . ويكفي لكل ١ مل من الدم مقدار ٤ مغ من مزيج أكسالات البوتاسيوم وفلوريد الصوديوم بنسبة ٣ : ١ . ويمكن مزج الملحين بهذه النسبة ووضع حوالي ٤ مغ في الأنبوب قبل أخذ الدم . وبدلاً من ذلك يمكن تحضير محلول يحتوي ٠,١ المل منه على ٣ مغ من أكسالات البوتاسيوم و ١ مغ من فلوريد الصوديوم . ضع ٠,١ مل في كل أنبوب ودع الماء يتبخر (في درجة حرارة الغرفة أو في فرن بدرجة حرارة ٦٠°س ، مع وقايتها من الغبار) وذلك قبل استعمال الأنابيب في أخذ الدم . وهذه النماذج ملائمة أيضاً لتحليل اليوريا . انقل البلازما بعد التنبيذ إلى أنبوب نظيف وجاف .

ولجميع الاختبارات الكيميائية السريرية الأخرى الموصوفة في هذا الكتيب ، يمكن استعمال أنابيب عادية بدون مضاد للتخثر ، ويفصل المصل بالتنبيذ بعد تخثر الدم . وبدلاً من ذلك يمكن استعمال أنابيب تحتوي على هيبارين الليثيوم كمضاد للتخثر (١٥–٢٠ و د/مل = وحدة دولية/مل من الدم) ، وتفصل البلازما بعد التنبيذ للتحليل .

ويجب استعمال المصل أو البلازما في الاختبارات الكيميائية السريرية بأسرع وقت ممكن . وإذا لم يمكن إجراء التحليل فوراً ، تحفظ البلازما في الثلاجة (البرّاد) مدة أقصاها ٣ أيام .

٤–٢ ضمـان الجـودة

ذكرنا أنه لكي يعطي المختبر نتائج للعينات يمكن التعويل عليها ، يجب استعمال إجراءات صحيحة خلال جميع مراحل عملية الحصول على عينات الدم وتحضير الكواشف وتنفيذ التحليل وكتابة تقرير بالنتائج . ويشمل ضمان الجودة جميع هذه النواحي من عمل المختبر .

ومن المهم اتباع التعليمات الخاصة بتحضير الكواشف وثباتها وإجراء تعيير وصيانة للأجهزة على فترات منتظمة .

إن عينات تضبيط الجودة المطلوب استعمالها مع كل دفعة من عينات المرضى موصوفة تحت كل اختبار . ويحصل على أمصال تضبيط الجودة من المختبر الوطني المركزي أو من المزودين التجاريين . وتوجد تعليمات مفصّلة لتحضير مصل حيواني ثابت لتضبيط الجودة في احدى مطبوعات منظمة الصحة العالمية [4] . ومثل هذا المصل ملائم للاختبارات المذكورة في هذا الكتيب (كما يمكن مراجعة المراجع الأخرى [2, 5, 10, 12, 17]) .

٤-٣ **قياس ألبومين المصل/أو البلازما (المصورة)** . الطريقة : خضرة البروموكريزول

قراءات التماصّ في هذه الطريقة تؤخذ مباشرة لكل أنبوب بعد مزج المعيار أو الشاهد أو عينة المريض بمحلول الملّون الشغّال .
القياس اللوني : مرشحة برتقالية ، إيلفورد ٦٠٧ (٦٠٠ نم) القياس الطيفي : ٦٣٢ نم اضبط الجهاز على تماصّ صفر بمحلول الملوّن الشغّال
ضع لصاقات تعريف على عدد كافٍ من الأنابيب لكل مساحة تشمل المعيار (م) والشواهد (ش١ ش٢) وعينات المرضى 1 ، 2 ، 3 وهلمّ جرّا)
ضع بممص في الأنابيب كما يلي :

	المعيار (م)	الشواهد (ش١ ش٢)	العينة ١ ، ٢ ، ٣ الخ
محلول الملون الشغال (مل)	٤,٠	٤,٠	٤,٠
المعيار : ٥٠ غ/ل (مكل)	٢٠	–	–
الشواهد (مكل)	–	٢٠	–
عينة المريض (مكل)	–	–	٢٠

امزج الانبوب (م) جيداً فور إضافة مقدار الـ ٢٠ مكل ، واقرأ التماص ، ثم تابع باضافة ٢٠ مكل من الشاهد إلى الأنبوب « ش ١ » ، امزج جيداً واقرأ التماص . تابع بهذه الطريقة باضافة ٢٠ مكل من كل عينة إلى كل أنبوب وقراءة التماص قبل التحوّل إلى العيّنة الأخرى . **ملاحظة** : يلزم كفيء مصل أو بلازما serum/plasma blank اذا كانت عينة المريض شديدة العكر (انظر الإجراءات لمزيد من التفاصيل) . احسب النتائج مقدرة بالغرام باللتر (غ/ل) تحقق من نتائج الشواهد

٤-٣ الألبومين . الطريقة : خضرة البروموكريزول

٤-٣-١ المبدأ

للألبومين القدرة على ربط بعض الملوّنات . وعندما ترتبط خضرة البروموكريزول بالألبومين يحدث انزياح shift في طول موجة امتصاص absorption الذروة للملوّن . يخفف المصل بمحلول

خضرة البروموكريزول المدروء عند الباهاء ٤,٢ . وقياس التماصّ absorbance على موجة طولها ٦٣٢ نم (مرشحة رقم ٦٠٧) خلال ٣٠ ثانية من مزج المصل بخضرة البروموكريزول يتلافى إلى حد كبير مشكلة التفاعل اللانوعي لخضرة بروموكريزول مع الغلوبلينات .

٤-٣-٢ الأجهزة والكيماويات

- الزجاجيات :
  - حوجلتان حجميتان (١ لتر و ١٠٠ مل)
  - ممصات حجمية (٢٠ مكل)
  - ممصات مدرّجة (١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - دوارق (٥٠٠ مل و ١ لتر)
  - قوارير للكواشف (١ لتر)
  - أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
  - مخابير (اسطوانات مدرجة) قياس (١ لتر)
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٦٣٢ نم
- مقياس لوني ، مرشحة برتقالية ، إيلفورد ٦٠٧ (٦٠٠ نم)
- مقياس الباهاء pH meter
- الكيماويات
  - خضرة البروموكريزول ، ملح صوديومي (يسمى أيضاً BCG) ذوّاب في الماء
  - آزيد الصوديوم . **تحذير** : تداوله بعناية
  - كلوريد الصوديوم
  - حمض السكسينيك
  - هيدروكسيد الصوديوم
  - « بريج ٣٥ » Brij-35 (بولي أوكسي ايثيلين (٢٣) لوريل ايثر)
  - دوارىء معيارية لمقياس الباهاء
  - ألبومين بقري ، أو أي مُعيار calibrator آخر متاح .

٤-٣-٣ الكواشف

١ - **محلول حمض السكسينيك ، ٥٠ غ/ل** : زِنْ ١ غ من حمض السكسينيك ذوّبه في ماء مقطر وأكمل إلى حوالي ٢٠ مل . حضِّر بالقدر المطلوب ، واطرح الباقي بعد الاستعمال .

٢ – **محلول هيدروكسيد الصوديوم ١٠ غ/ل** . زن ١ غ من هيدروكسيد الصوديوم وذوّبه في ماء مقطر وأكمل إلى ١٠٠ مل . هذا المحلول ثابت عدة أشهر في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٣ – **محلول « بريج ٣٥ » "Brij-35" ٢٥٠ غ/ل** . أدفىء ٢٥ غ من « البريج ٣٥ » الصلب في حجم صغير من الماء المقطر إلى أن يذوب ، وأكمل إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر .

٤ – **محلول الملوّن الشغال** . ذوّب ٥,٦ غ من حمض السكسينيك ، و ٥٨ غ من خضرة البروموكريزول (ملح صوديومي) ، و ١٠٠ مغ من آزيد الصوديوم ، في حوالي ٩٠٠ مل من الماء المقطر . أضف ١ غ من هيدروكسيد الصوديوم وذوّبه ، ثم أضِفْ ٢,٥ مل من محلول « البريج ٣٥ » . اضبط الباهاء على ٤,٢ باستعمال أحجام صغيرة من محلول هيدروكسيد الصوديوم أو محلول حمض السكسينيك عند اللزوم . انقل المحلول بتؤدة (تجنب احداث رغوة) إلى حوجلة حجمية سعتها ١ لتر وأكمل حجمها بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت عدة أشهر في درجة حرارة ٢–٨°س .

ملاحظة : يتطلب محلول ملوّن خضرة البروموكريزول الشغال عناية في التحضير . وقد تجد بعض المختبرات أن شراء هذا المحلول أقل كلفة من الناحية الاقتصادية . وتوجد عدة كواشف مختلفة من خضرة البروموكريزول ، وعليك أن تتأكد من اختيار كاشف خضرة البروموكريزول في دارئة السكسينيك succinate buffer بباهاء ٤,٢ .

واذا استعمل كفيت cuvette ذو مسار ضوئي ١٠ مم ، يكون لمحلول الملّون الشغال قراءات التَمَاصّ الآتية (صفّر الجهاز على الماء المقطر) :

المقياس الطيفي		المقياس اللوني	
طول الموجة	التماص	المرشحة	التَمَاصّ
٤٣٠ نم	حوالي ١,٤	٦٠١	حوالي ١,١
٦١٥ نم	حوالي ٠,٢٥	٦٠٧	حوالي ٠,٢

٥ – **محلول دارئة السكسينات** : حضرّها بنفس طريقة تحضير محلول الملوّن الشغال ، ولكن لا تُضِفْ خضرة البروموكريزول . وهذا المحلول ثابت عدة أشهر في درجة حرارة ٢–٨°س .

٦ – **معيار الألبومين ٥٠ غ/ل** : راجع قسم « إجمالي البروتين » (٤–١٣) ووصف معيار البروتين (ألبومين بقري ١٠٠ غ/ل) . خفّف ٥,٠ مل من معيار الألبومين البقري (١٠٠

غ/ل) بواسطة ٥,٠ مل من محلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم لتحضير معيار من الألبومين يحتوي على ٥٠ غ/ل . وهذا المعيار ثابت مدة ستة أشهر في درجة حرارة ٢–٨°س . راجع المعتارات البديلة في الفقرة ٤–١٣–٥ . ويمكن أيضاً استعمال مصل مرجعي له قيمة معزوّة من الألبومين ، ويجب أن لا يكون هذا المصل عكراً .

٧ – **محلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم** : زن ٩ غ من كلوريد الصوديوم و ١,٠ غ من آزيد الصوديوم . ذوّبها في ماء مقطر وأكمل إلى اللتر . وهذا المحلول ثابت مدة غير محددة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٤–٣–٤ طريقة العمل

١ – ضع بمص ٤,٠ مل من محلول الملوّن الشغّال في عدة أنابيب اختبار .

ملاحظة : اذا كانت عيّنة المصل مفرطة شحم الدم **lipaemia** بدرجة كبيرة ، فيجب استعمال كفيء مصلي ، (فرط شحم الدم المعتدل لا يؤثر على النتائج) . يُحضَّر الكفيء بإضافة ٢٠ مكل من العيّنة إلى ٤,٠ مل من محلول دارئة السكسينات . ويُطرح تَمَاصّ هذا الكفيء ، مع الماء كمرجع ، من تَمَاصّ الاختبار . والنماذج المنحلّة بدرجة كبيرة لا تصلح لتعيين الألبومين .

٢ – أضف ٢٠ مكل من محلول المعيار أو الشاهد أو العينة ، وامزج ثم اقرأ التماص فوراً (خلال ٣٠ ثانية) .

٣ – اقرأ التماص على موجه طولها ٦٣٢ نم (أو مرشحة رقم ٦٠٧) بعد ضبط الجهاز على تماص الصفر بمحلول الملوّن الشغّال .

٤–٣–٥ التعيير calibration

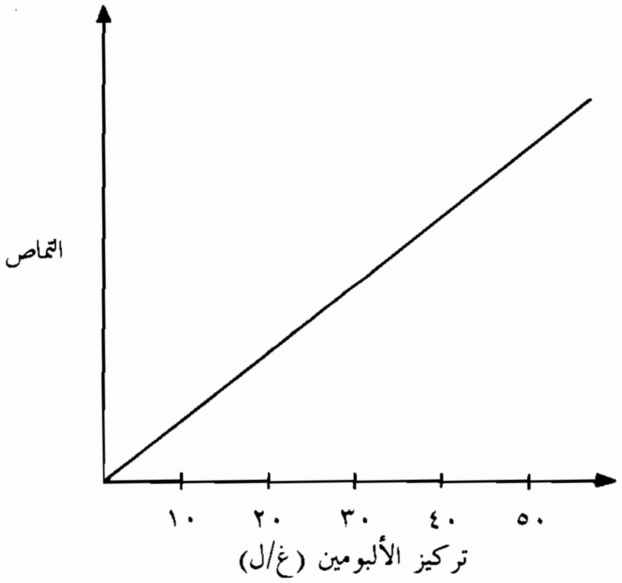
تحضير محاليل معيار الألبومين الشغّال : تحضّر هذه المحاليل بتخفيف معيار الألبومين (٥٠ غ/لتر) بمحلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم كما يلي :

رقم المعيار الشغّال	١	٢	٣	٤	٥
معيار الألبومين ٥٠ غ/ل (مل)	٠,٢	٠,٤	٠,٦	٠,٨	١
محلول كلوريد الصوديوم آزيد الصوديوم (مل)	٠,٨	٠,٦	٠,٤	٠,٢	صفر
تركيز معايير الألبومين الشغال (غ/ل)	١٠	٢٠	٣٠	٤٠	٥٠

تحضير مخطط التعيير

محلول الملوِّن الشغّال (مل)	٤,٠	٤,٠	٤,٠	٤,٠	٤,٠
رقم المعيار الشغّال ، ٢٠ مكل	(١)	(٢)	(٣)	(٤)	(٥)
امزج كل أنبوب مزجاً جيداً					
اقرأ التماصّ لكل أنبوب فوراً على موجة طولها ٦٣٢ نم (أو مرشحة رقم ٦٠٧) بعد ضبط الجهاز على الصفر بمحلول الملوِّن الشغّال ويجب أن يكون تماص أعلى معيار حوالي ٠,٦٧					

ارسم المخطط :



ويجب أن يكون مخطط التعيير خطّياً حتى ٥٠ غ/ل . وإذا كان المخطط خطياً ، أمكن استعمال معيار واحد (٥٠ غ/ل) للتحليل الروتيني ، ولكن يجب التثبّت من الخطية لكل دفعة جديدة من محلول الموِّن الشغّال ، وكذلك مرة كل شهر على الأقل .

وتقترح الطريقة المحبّذة استعمال محلول الألبومين البقري المعياري كمعتار . والبدائل له هي محاليل الألبومين البقري التجارية ، أو معكرات مصلية مجفدة lyophilized بمقادير تم تعيينها بطريقة خضرة البروموكْريزول ، أو ألبومين مصل بشري قديم من قسم نقل الدم . استعمل تركيز الألبومين

المنصوص عليه كقيمة للمعيار ، والقارورة الواحدة تبقى عدة أشهر في درجة حرارة ٢–٨°س ، إذا سحبت منها مقادير صغيرة (٥–١٠ مل) حسب الحاجة باستعمال زراقة معقمة .

٤–٣–٦ الحساب

ارسم قيم التماصّ للمعايير واقرأ تركيز الألبومين في العينات والشواهد من المخطط ، أو استعمل معيار ٥٠ غ/ل إذا كان الرسم البياني خطياً واحسب كما يلي :

$$\text{تركيز الألبومين} = \frac{\text{خ}}{\text{م}} \times 50 \ \text{غ/ل}$$

حيث تكون خ = تماص الاختبار

م = تماص المعيار

٤–٣–٧ تضبيط الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب إمكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ٣٪

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدى قيمة تباين الشروط الروتينية ستة بالمئة (٦٪)

٤–٣–٨ القيم المرجعية

القيم المرجعية التقريبية للبالغين السائرين « الأصحاء » "healthy" ambulant :
٣٠–٤٥ غ/ل

وللتحويل من النظام الدولي إلى الوحدات « القديمة » : $\frac{\text{غ/ل}}{10}$ = غ/١٠٠ مل

٤–٣–٩ المراجــع

Spencer, K. & Price, C.P. (1977) **Ann. Clin. Biochem., 14,** 105-115.
Webster, D. (1977) **Chin. Chem., 23,** 663.

٤-٤ قياس الفسفاتاز القلوية في المصل أو البلازما . الطريقة : ٤-نتروفينول

قم بتوسيم أنابيب اختبار تكفي لكفيء الكاشف (ك) ، والشواه (ش ١ ، ش ٢) وعينات المرضى (١ ، ٢ ، ٣ الخ .)			
ضع بممص في الأنابيب ما يأتي :			
	ك	ش ١ ، ش٢	١، ٢، ٣ الخ
– دارئة امينو-ميثيل-بروبانول (مل)	١,٤	١,٤	١,٤
أدْفىء جميع الأنابيب الى درجة حرارة ٣٧°س لمدة ٥ دقائق			
– أضِفْ ماءً مقطراً (مكل)	٥٠	–	–
– أضِفْ المصل أو البلازما أو الشواهد (مكل)	–	٥٠	٥٠
امزج جميع الأنابيب واتركها في درجة حرارة ٣٧°س			
– اضِفْ محلول الركيزة في فواصل زمنية محدّدة (مكل)	١٠٠	١٠٠	١٠٠
احضن في درجة حرارة ٣٧°س مدة ١٥ دقيقة			
– اضِفْ هيدروكسيد الصوديوم في فواصل زمنية محددة (مل)	٤,٠	٤,٠	٤,٠
امزج جيداً وبرِّد إلى درجة حرارة الغرفة وقِسْ التَمَاصّ			
مقياس اللون : مرشحة بنفسجية ، إيلفورد رقم ٦٠٠ (٤١٠ نم) المقياس الطيفي : ٤١٠ نم اضبط الجهاز على التماصّ صفر بواسطة كفيء الكاشف			
احسب النتائج و/ل من مخطط التعيير تحقق من نتائج الشواهد			

٤-٤ الفسفاتاز القلوية . الطريقة : ٤-نتروفينول

٤-٤-١ المبـدأ

تقوم الفسفاتاز القلوية بحلمهة hydrolysis ٤-نتروفنيل فسفات في باهاء pH ١٠,٣ ودرجة الحرارة ٣٧°س فيتحرر ٤-نتروفينول . يضاف قلوي لإيقاف نشاط الإنظيم في نهاية فترة الحضانة المحدّدة ، وتقاس الزيادة في التَماصّ نتيجة للـ٤-نتروفينول المنطلق بموجة طولها ٤١٠ نم .

٤-٤-٢ الأجهـزة والكيماويات

- الأواني الزجاجية
- حواجل حجمية (بالحجمين ١٠٠ مل و ١ لتر)
- دوارق (١ لتر)
- مخابير مدرجة (١٠٠ مل و ١ لتر)
- أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
- ممصات حجمية (١٠٠ و ٢٠٠ مكل)
- ممصات مدرّجة (٥ مل بتدريج ٠,١ مل)
- قوارير كواشف من البولي اثيلين (سعة ١ لتر)
- حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧°س
- مقياس باهاء **pH meter**
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٤١٠ نم
- مقياس لوني ، مرشحة بنفسجية ، إيلفورد ٦٠٠ (٤١٠ نم)
- الكيماويات
- محاليل دارئة معيارية لمقياس الباهاء
- حمض الهدروكلوريك ، مركزّ (٣٧٪ وزن/حجم) **تحذير** : أكّال قوي
- ٢-أمينو-٢-ميثيل-١-بروبانول
- كلوريد المغنزيوم ، (سداسي الهيدرات)
- فسفات ٤ نتروفنيل ثنائي الصوديوم ، سداسي الهيدرات
- هيدروكسيد الصوديوم ، حُبَيْبات
- ٤-نتروفينول

٤-٤-٣ الكواشـف

١ - **دارئة الأمينومتيل بروبانول باهاء ١٠,٣** . ذوّب ٧٨,٥ غ من ٢-أمينو-٢-ميثيل-١-بروبانول في حوالي ٩٠٠ مل من الماء . اضبط الباهاء على ١٠,٣ بحمض الهدروكلوريك المركزّ (حوالي ١٨ مل) وأكمِلْ إلى اللتر بالماء . اخزن في قارورة كاشف من عديد الايثيلين مسدودة بإحكام . هذا المحلول ثابت لمدة شهر في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢ - **محلول كلوريد المغنزيوم ، ١,٥ ممول/ل** . ذوّب ٣٠٠ مغ من كلوريد المغنزيوم ، السداسي الهيدرات ، في الماء وأكمِلْ إلى اللتر . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٣ – **محلول الركيزة ٢٢٥ ممول/ل في محلول كلوريد المغنزيوم** . ذوّب ٨٣,٥ مغ من فسفات ٤–نتروفنيل ثنائي الصوديوم ، سداسي الهيدرات ، في ١,٠ مل من محلول كلوريد المغنزيوم حسب الحاجة . هذا المحلول ثابت لمدة يوم عمل واحد .

٤ – **محلول هيدروكسيد الصوديوم ، ٢٥٠ ممول/ل** . ذوّب ١٠ غ من هيدروكسيد الصوديوم في ماء وأكمِلْ إلى اللتر . اخزن في قارورة من البولي ايثلين مسدودة بإحكام . هذا المحلول ثابت مدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٥ – **محلول ٤–نتروفينول الخزين ١٠,٨ ممول/ل** . زن ١٥٠ مغ من ٤–نتروفينول وضَعْها في حوجلة حجمية سعتها ١٠٠ مل وأكمل إلى ١٠٠ مل بماء مقطر . هذا المحلول ثابت لمدة ٦ أشهر في الظلام في درجة حرارة ٤°س .

٦ – **محلول ٤–نتروفينول الشغّال ٥٤ مكمول/ل** . ضع بممص ٠,٥ مل من محلول ٤–نتروفينول الخزين في حوجلة حجمية سعتها ١٠٠ مل وأكمِلْ إلى ١٠٠ مل بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (٢٥٠ ممول/ل) . حضِّر هذا المحلول طازجاً قبل الاستعمال .

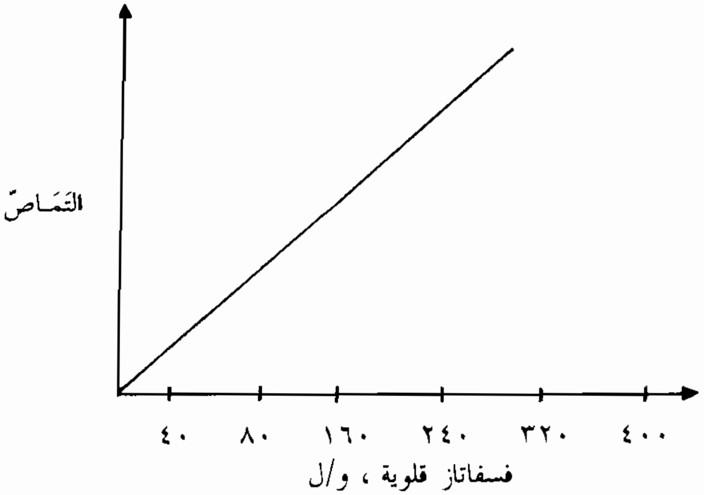
ملاحظة : يجب التحقق من جودة فسفات ٤–نتروفنيل ثنائية الصوديوم للتأكد من أنها لا تحتوي على كميات مفرطة من الـ ٤–نتروفينول الحر . حضِّر محلول هيدروكسيد الصوديوم (١٠ ممول/ل) بتخفيف ٤,٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٢٥٠ ممول/ل) إلى ١٠٠ مل بماء مقطر .

أضِفْ ٢٠٠ مكل من محلول الركيزة substrate solution (الكاشف ٣ أعلاه) إلى ٣,٨ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (١٠ ممول/ل) . امزجْ وقِسْ التَمَاصّ بموجة طولها ٤١٠ نم بعد ضبط صفر المقياس الطيفي بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (١٠ ممول/ل) . وتكون جودة الركيزة مقبولة إذا كان التَمَاصّ بعد التخفيف في محلول هيدروكسيد الصوديوم أقل من ٠,٢٥ (كُفَيْت cuvette بمسار ضوء ١٠ مم ، في درجة حرارة الغرفة ، وموجة طولها ٤١٠ نم) . يجب الانتباه إلى أنه في مقياس اللون يجب أن يكون التَمَاصّ أقل من ٠,١٢ (كُفَيْت بمسار ضوء ١٠ مم ومرشحة إيلفورد رقم ٦٠٠) .

٤-٤-٤ تحضير مخطط التعيير

	رقم الانبـــوب					
	١	٢	٣	٤	٥	٦
محلول ٤-نتروفينول ، ٥٤ ممول/ل (مل)	١	٢	٤	٦	٨	١٠
هيدروكسيد الصوديوم ٢٥٠ ممول/ل (مل)	٩	٨	٦	٤	٢	صفر
النشاط (و/ل)	٤٠	٨٠	١٦٠	٢٤٠	٣٢٠	٤٠٠

امزج جيداً وقِسْ التماص لكل أنبوب على موجة طولها ٤١٠ نم (مرشحة بنفسجية ، إيلفورد ٦٠٠) مع ضبط صفر المقياس الطيفي بمحلول هيدروكسيد الصوديوم (٢٥٠ ممول/ل) . ضع تَمَاصّ كل أنبوب على المخطط .



حضِّر مخطط تعيير كل ثلاثة أشهر .

٤-٤-٥ طريقة العمـل

١ - ضع بممص ١,٤ مل من دارئة الأمينومثيل بروبانول في أنابيب اختبار تكفي لعينات المرضى والشواهد وكفيء الكاشف ، واحضنها سلفاً في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧°س لمدة حوالي ٥ دقائق .

٢ – أضِفْ إلى كل أنبوب ٥٠ مكل من المصل ، وإلى انبوب الكفيء ٥٠ مكل من الماء . امزج جيداً .

٣ – أضِفْ إلى كل أنبوب بالتسلسل ١٠٠ مكل من محلول الركيزة في فواصل موقّتة . امزج جيداً .

٤ – احضن في درجة حرارة ٣٧°س لمدة ١٥ دقيقة بالضبط ، ثم أضف ٤,٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٢٥٠ ممول/ل) إلى كل أنبوب بالتسلسل محافظاً على الفواصل الزمنية الموقّتة . امزج كل أنبوب ودَعْهُ يبرد إلى درجة حرارة الغرفة .

٥ – قِسْ التَمَاصّ لكل أنبوب بموجة طولها ٤١٠ نم (مرشحة بنفسجية ، إيلفورد ٦٠٠) بعد ضبط صفر المقياس الطيفي على الكفيء .

٦ – إذا كان التَمَاصّ أعلى من تَمَاصّ معيار قدره ٤٠٠ و/ل ، كرِّر الإجراء ، ولكن عند الخطوة ٤ احضن لمدة ٥ دقائق بالضبط (بدلاً من ١٥ دقيقة) ، ثم أضِفْ ٤,٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٢٥٠ ممول/ل) وأكمِلْ الإجراء الموصوف في الفقرتين ٤ و ٥ . لا تَنْسَ أن تضرب النشاط الناتج بـ ٣ قبل تدوين النتيجة .

٤-٤-٦ الحساب

اقرأ نشاط الفسفاتاز القلوية في العينات المختبرة وعينات الشواهد من مخطط التعيير . تذَّكْر أن تضرب في ٣ إذا كنت قد حضنت لمدة ٥ دقائق بدلاً من ١٥ دقيقة .

٤-٤-٧ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب إمكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ١٠٪ .

تباين الشروط الروتينية : يجب أن تكون هذه القيمة أقل من ٢٠٪ .

في كل دفعة من النماذج ، يجب إدراج نموذجين من مصلين شاهدين على الأقل لهما قيم معروفة تقع في المجال ٢٠–٣٥٠ و/ل ، على أن يكون أحدهما غير معلوم لمنفذ الاختبار وإذا كان التحليل لنماذج مفردة فيجب دائماً ضم نموذج شاهد .

ملاحظة : يلزم أن تستعمل مادة شاهدة بقيم معروفة تم الحصول عليها باستعمال دارئة الأمينومثيل بروبانول وفسفات ٤–نتروفنيل ، وعند استعمال دارئة ثنائي الايثانولامين تكون الأنشطة أعلى بكثير .

٤-٤-٨ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية :

ذكور (عمر ٢٠–٦٠ سنة) :	٢٠–٩٠ و/ل
اناث (عمر ١٥–٦٠ سنة) :	٢٠–٩٠ و/ل

أطفال (عمر ١ - ١٢ سنة) :	حتى ٣٥٠ و/ل
عنفوان النمو في البلوغ	حتى ٥٠٠ و/ل

٤-٤-٩ المراجـع

Bowers, G.N., Jr & McComb, R.B. (1975) **Clin. Chem., 21,** 1988-1995
Berger, L. & Rudolph, G.G. (1965) **Std. Methods Clin. Chem., 5,** 211-221.

٤-٥ قياس الاميلاز في المصل أو البلازما . بطريقة : النشا – اليود

قم بتوسيم عدد من الأنابيب (مدرجة عند ١٠ مل) يكفي لكفيء الكاشف (ك) والضوابط (ش١ ، ش٢) وعينات المرضى ١ ، ٢ ، ٣ الخ .			
ضع بالممص في الأنابيب ما يلي :			
	ك	ش١ ، ش٢	١،٢،٣ الخ
– ركيزة نشا مدروءة (مل)	١,٠	١,٠	١,٠
– ادفئْ جميع الأنابيب إلى درجة الحرارة ٣٧°س لمدة ٥ دقائق			
– أضف عينة الشاهد والمريض (مكل)		٢٠	٢٠
امزج واحضن في درجة حرارة ٣٧°س لمدة ٧ دقائق و ٣٠ ثانية بالضبط ثم أضِفْ :			
محلول اليود الشغّال (مل)	١,٠	١,٠	١,٠
امزج جيداً واضف ٨ مل ماء مقطر امزج جيداً واقرأ التماص بلا تأخير			
مقياس اللون : مرشحة حمراء ، إيلفورد رقم ٦٠٨ (٦٨٠ نم) مقياس طيفي : ٦٦٠ نم اضبط الجهاز على التَمَاصّ صفر بالماء المقطر			
احسب النتائج بالوحدة باللتر (و/ل) تحقَّقْ من التَمَاصّ في الأنبوب ك لرصد ثبات محلول الركيزة . تحقَّقْ من نتائج الشاهد .			

٤-٥ الأميلاز . الطريقة : النشا – اليود

٤-٥-١ المبـدأ

يتفاعل اليود مع النشا في محلول ليعطي مركباً ذا لون أزرق–بنفسجي شديد . وتقوم الأميلاز بحَلْمهة hydrolysis النشا لتكُون المالتوز وجزيئات صغيرة أخرى لا تتفاعل مع اليود . فبعد حضانة المصل مع محلول نشا مدروء ، يتم تقدير كمية النشا المتبقية بقياس التَمَاصّ بموجة طولها ٦٦٠ نم بعد إضافة اليود [13] .

٤-٥-٢ الأجهـزة والكيماويات

- الزجاجيات
  - حواجل حجمية (بحجم ١ لتر)
  - ممصات حجمية (٢٠ مكل)
  - ممصات مدرّجة (١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - دوارق (١ لتر)
  - مخابير مدرّجة (١٠٠ مل و ١ لتر)
  - قوارير قاتمة للكواشف (١٠٠ مل و ١ لتر)
- موقد حرّاق بنزن أو سخّانة
- حمام مائي ، ٣٧°س
- مقياس باهاء pH meter
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٦٦٠ نم
- مقياس اللون ، مرشحة حمراء ، إيلفورد ٦٠٨ (٦٨٠ نم)
- الكيمـاويات
  - نشا ذوّاب soluble starch ، درجة صيدلانية
  - يوديد البوتاسيوم potassium iodide
  - يودات البوتاسيوم potassium iodate
  - فسفات ثنائية الصوديوم ، اللامائية
  - كلوريد الصوديوم
  - حمض البنزويك benzoic acid
  - حمض الهدروكلوريك ، المركز (٣٧٪ وزن/حجم) **تحـذير** : أكّال قوي
  - دارئة لمقياس الباهاء

٤-٥-٣ الكواشـف

١ - **ركيزة نشا مدروءة** . ذوّب ٢٦,٦ غ من الفسفات ثنائية الصوديوم اللامائية و ١,٧٥ غ من كلوريد الصوديوم ، ٨,٦ غ من حمض البنزويك ، في حوالي ٥٠٠ مل من الماء المقطر في دورق كبير . سخّن حتى الغليان . امزج على حدة٠,٤ غ من النشا الذوّاب في ١٠ مل من الماء المقطر البارد لتكوين عجينة . أضِف العجينة مع التقليب الى المزيج المغلي مع شَطْف الدورق بالماء المقطر . تَابعْ الغلي لمدة دقيقة واحدة . برِّدْ إلى درجة حرارة الغرفة . وانقل المزيج إلى حوجلة حجمية وخفِّفْهُ إلى ١ للتر بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت مدة سنة على

الأقل في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س ، ويجب أن تكون باهاؤه pH ٦,٩–٧,١ . ويمكن رصد الثبات بملاحظة تَمَاصّ كفيء الكاشف مع كل مجموعة من الاختبارات .

٢ – **محلول اليود الخزين ٥٠ مول/ل** . ذَوِّبْ ٣,٥٧ غ من يودات البوتاسيوم و ٤٥ غ من يوديد البوتاسيوم في حوالي ٨٠٠ مل من الماء المقطر . أضِفْ ببطء ومع المزج ٩,٠ مل من حمض الهدروكلوريك المركز . خفِّفْ إلى اللتر بالماء المقطر . يجب خزن هذا المحلول في قارورة قاتمة . وهو ثابت مدة سنة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٣ – **محلول اليود الشغّال** : خفِّفْ ١٠ مل من محلول اليود الخزين بالماء المقطر ٩٠ مل في مخبار مدرج سعته ١٠٠ مل . يجب خزن هذا المحلول في قارورة قاتمة وهو ثابت مدة شهرين في درجة حرارة ٢–٨°س .

٤–٥–٤ طريقة العمل

١ – ضَعْ بالممص ١,٠ مل من ركيزة النشا المدروءة في أنابيب اختبار سعتها ١٥٠ × ١٦ مم . تحتاج إلى أنبوب لكل عينة مريض وعينة شاهد وأنبوب لكفيء الكاشف .

٢ – ضع جميع الأنابيب في حمام مائي بدرجة ٣٧°س مدة ٥ دقائق لتدفئة محتوياتها .

٣ – ضع بممص ٢٠ مكل من مصل المريض أو المصل الشاهد في قاع أنابيب الاختبار . امزج واحضن في درجة حرارة ٣٧°س لمدة ٧ دقائق و ٣٠ ثانية بالضبط (لا يضاف مصل إلى أنبوب كفيء الكاشف) .

٤ – بعد ٧ دقائق و ٣٠ ثانية أخرِجْ أنابيب الاختبار من الحمام المائي ، وأضِفْ على الفور ١,٠ مل من محلول اليود الشغّال إلى كل أنبوب (العينات وكفيء الكاشف) . ثم أضِفْ ٨ مل من الماء المقطر .

٥ – امزج محتويات كل أنبوب جيداً ثم قِسْ التَمَاصّ بدون تأخير بموجة طولها ٦٦٠ نم (مرشح أحمر ، إيلفورد رقم ٦٠٨) بعد ضبط المقياس الطيفي على الصفر بالماء المقطر .

ملاحظـة : تجب الحيطة حين المَصّ لتجنب تلويث الممصات باللعاب لأنه يحتوي على أميلاز .

٤–٥–٥ الحسـاب

$$\text{نشاط الأميلاز ، و/ل} = \frac{\text{ك} - \text{خ}}{\text{ك}} \times ١٤٧٠$$

ك = تماص كفيء الكاشف

خ = تماص الاختبار

١٤٧٠ = عامل للتعبير عن القيم بالوحدات في اللتر (و/ل)

إذا كانت النتيجة أكثر من ٧٣٥ و/ل (أي لا يوجد لون أزرق في الأنبوب خ) يجب تخفيف العينة بمحلول ملحي (٢٠ مكل مصل + ١٠٠ مكل محلول ملحي) ، ويُعاد التحليل باستعمال ٢٠ مكل من العينة المخففة . ويجب ضرب القيمة المقيسة في ٦ لحساب النشاط الأميلازي في العينة أخذاً لعامل التخفيف في الاعتبار .

٤-٥-٦ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف حوالي ٦٪

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدى هذه القيمة ١٢٪

يجب تحليل عينة ضمان الجودة بقيمة تتراوح بين ٢٠٠ و ٧٠٠ و/ل مع كل دفعة من النماذج . واذا كان التحليل يجري على نماذج مفردة ، فيجب دائماً ضم نموذج شاهد .

٤-٥-٧ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية : ٧٠-٣٤٠ و/ل

٤-٥-٨ المراجع

Caraway, W.T. (1959) **Am. J. Clin. Pathol., 32,** 97-99.
Martinek, R.G. (1964) **Clin. Chem. Acta., 9,** 590-592. (13)

٤-٦ قياس ناقلة الأمين الأسبارتية « أسات » في المصل أو البلازما . بطريقة : مقياس اللون

قم بتوسيم عدد من الأنابيب يكفي لكفيء الكاشف (ك) ، والمعيار (م) ، والشواهد (ش١ ، ش٢) وعينات المرضى (١،٢،٣، الخ) ، وكفيئات الشواهد (ك١ش ، ك٢ش) وكفيئات عينات المرضى (١ ك ، ٢ ك ، ٣ ك ، الخ) .

استخرج جزءاً من معيار البيروفات من المجمّدة وذوّبه وامزجه جيداً

ضع بالممص في الأنابيب ما يأتي :

	ك	م	ش١ ، ش٢ ١،٢،٣ الخ	ك١ ش، ك٢ ش ١ك،٢ك،٣ك
– كاشف ركيزة مدروءة (مل)	٠,٥	٠,٥	٠,٥	٠,٥
– ضع كاشف الركيزة المدروءة . ثانية في الثلاجة				
– أدفىء جميع الأنابيب في درجة الحرارة ٣٧°س لمدة ٥ دقائق				
– بعد ذلك أضِفْ الماء المقطر (مكل)	١٠٠	–	–	–
– معيار البيروفات (مكل)	–	١٠٠	–	–
– عينة الشاهد أو المريض (مكل)	–	–	١٠٠	–
امزج واحفظ جميع الأنابيب في درجة الحرارة ٣٧°س لمدة ٦٠ دقيقة ، ثم أضِفْ :				
– كاشف اللون (مل)	٠,٥	٠,٥	٠,٥	٠,٥
– عيّنة الشاهد أو المريض (مكل)	–	–	–	١٠٠
– امزج : وبعد ٢٠ دقيقة في درجة حرارة الغرفة أضِفْ محلول هيدروكسيد الصوديوم ٤٠٠ ممول/ل (مل)	٥,٠	٥,٠	٥,٠	٥,٠

امزج جيداً وتريّث ٥ دقائق ، ثم قِسْ التَمَاصّ

مقياس اللون : مرشحة خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٤ (٥٢٠ نم)
مقياس طيفي : ٥٠٥ نم
اضبط صفر الجهاز على الانبوب ك (كفيء الكاشف) .

احسب كمية البيروفات المشكلة واستعمل الجدول للتحويل إلى « أسات ASAT » (و/ل)
تحقّق من نتائج الشواهد .

٤-٦ ناقلة الأمين الأسبارتية (أسات ASAT) . الطريقة : مقياس اللون

٤-٦-١ المبـدأ

تقوم ناقلة الأمين الأسبارتية (أسات ، SGOT) بتحويل الألفا-كيتو-غلوتارات إلى غلوتامات ، والأسبارتات إلى أكسالوأسيتات ، بنقل زمرة أمينية . وتتفاعل الأكسالوأسيتات المتشكلّة مع ٢ ، ٤-ثنائي نتروفنيل هدرازين لانتاج مركب ملوَّن يقاس تَمَاصُّه في محلول قلوي بموجة طولها ٥٠٥ نم .

٤-٦-٢ الاجهزة والكيماويات

- الزجاجيات
  - حواجل حجمية (حجم ١٠٠ مل و ١ لتر)
  - مخابير مدرجة (١ لتر)
  - ممصات حجمية (١٠٠ مكل)
  - ممصات مدرّجة (١ مل و ١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - أنابيب اختبار (١٥٠ × ١٦ مم)
  - دوارق (١٠٠ مل و ١ لتر)
  - قوارير للكواشف (٢٥٠ مل و ١ لتر)
- حمام مائي ، ٣٧°س
- مقياس باهاء pH meter
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٥٠٥ نم
- مقياس اللون ، مرشحة خضراء ، إيلفورد ٦٠٤ (٥٢٠ نم)
- الكيماويات
  - ثلاثي الايثانولامين ، درجة تحليلية
  - حمض اثيلين ديامين تتراسيتيك ، ملح ثنائي الصوديوم ، ثنائي الهيدرات
  - فسفات ثنائية الصوديوم ، اللامائية ، درجة تحليلية
  - فسفات أحادية البوتاسيوم ، اللامائية ، درجة تحليلية
  - حمض الألفا-كيتوغلوتاريك
  - حمض الأسبارتيك - DL
  - هيدروكسيد الصوديوم
  - ٢ ، ٤- ثنائي نتروفنيل هدرازين (مع ماء) . **تحذير** : قد ينفجر بشدة عندما تكون جافة

- حمض الهدروكلوريك ، مركزّ (٣٧٪ وزن/حجم) **تحذير** : أكال قوي
- كلوروفورم
- بيروفات الصوديوم ، درجة تحليلية .

٤-٦-٣ الكواشف

١ - **دارئة الفسفات ، باهاء ٧,٤** . ذوّب ١١,٩ غ من الفسفات ثنائية الصوديوم (اللامائية) و ٢,٢ غ من الفسفات أحادية البوتاسيوم (اللامائية) في ماء مقطر وأكمِلْ إلى اللتر . تحقَّقْ من الباهاء واضبطها على ٧,٤ إذا لزم الأمر باستعمال كميات صغيرة من الفسفات المناسبة (مثلاً إذا كانت الباهاء أعلى من ٧,٤ أضِفْ الفسفات أحادية البوتاسيوم) . وهذا المحلول ثابت لمدة تقرب من شهرين في درجة حرارة ٢-٨°س .

٢ - **محلول هيدروكسيد الصوديوم ، ١ مول/ل** . ذوّب ببطء ٤٠,٠ غ من هيدروكسيد الصوديوم في ماء مقطر وأكمِلْ إلى اللتر . اخزن المحلول في قارورة كاشف مسدودة بإحكام . وهذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٣ - **كاشف الركيزة المدروءة** . ضع ٢٩,٢ مغ من حمض الألفاكيتوغلوتاريك و ٢,٦٦ غ من حمض الأسبارتيك- DL في دورق صغير . ذوّبهما في ٢٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (١ مول/ل) . ثم اضبط الباهاء على ٧,٤ بمزيد من محلول هيدروكسيد الصوديوم . انقل المحلول إلى حوجلة حجمية سعة ١٠٠ مل وأكمِلْ إلى ١٠٠ مل بدارئة الفسفات ، أضِفْ ١ مل من الكلوروفورم كحافظ واخزن في درجة حرارة ٤-٨°س . هذا المحلول ثابت في الظروف العادية مدة أسبوعين في درجة حرارة ٢-٨°س ، ولكن يجب طرحه قبل ذلك إذا صار عكراً .

ملاحظة : قد تجد المختبرات التي تُجري عدداً قليلاً فقط من تحليلات الأسات (SGOT) أنه من الأوفر اقتصادياً شراء كاشف الركيزة المدروء . والكواشف التي تباع لطرائق الموجات فوق البنفسجية (٣٤٠ نم) ليست ملائمة للطريقة الموصوفة هنا .

٤ - **حمض الهدروكلوريك ١ مول/ل** . خفّف ٩ مل من حمض الهدروكلوريك (المركّز) الى ١٠٠ مل بالماء المقطّر .

٥ - **كاشف اللون ، ٢ ، ٤- دينيتروفنيل هدرازين ١ مول/ل** . ذوّب ما يساوي ١٩,٨ مغ من ٢ ، ٤- دينيتروفنيل هدرازين جاف في ١٠٠ مل من حمض الهدروكلوريك (١ مول/ل) ، لاحظ أنه يجب تعديل وزن ٢ ،٤-دينيتروفنيل هدرازين لإدخال محتواه من الماء في الحسبان والمحلول المحضَّر ثابت لمدة شهرين في درجة حرارة ٢-٨°س .

٦ – **محلول هيدروكسيد الصوديوم ، ٤٠٠ ممول/ل** . ذوّب ١٦,٠ غ من هيدروكسيد الصوديوم في ماء مقطر وأكمل إلى اللتر . اخزنه في قارورة كاشف مسدودة بإحكام . وهذا المحلول ثابت لمدة غير محدودَة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٧ – **دارئة الإيديتات ثلاثي ايثانولامين** . زِنْ ٣,٩ غ من ثلاثي ايثانولامين triethanolamine و ١ غ من إيديتات الصوديوم ذوبّهما في حوالي ٢٠٠ مل من الماء المقطر ، وأضِفْ ١٥ مل من حمض الهدروكلوريك (١ مول/ل) . أكمِلْ إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر . تحقق من كون الباهاء ٧,٥ – ٧,٦ . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢–٨°س .

٨ – **محلول البيروفات المعياري ٤ ممول/ل** . زن ٤٤ مغ من بيروفات الصوديوم وأكمل الى ١٠٠ مل في حوجلة حجمية بدارئة الإيديتات وثلاثي ايثانولامين أ . امزج المحلول جيداً وقَسِّمه إلى أقسام صغيرة (حوالي ١ مل) واخزنه في مجمّدة الثلاجة . هذا المحلول المعياري ثابت لمدة ٦ أشهر عندما يكون مجمَّداً ولمدة أسبوع في درجة حرارة ٢–٨°س .

٤–٦–٤ طريقة العمل

١ – يلزم أنبوبا اختبار اثنان لكل عيّنة مصل أو شاهد (أنبوب « للاختبار » والثاني لكفيء العيّنة) ، وانبوب لكفيء الكاشف وأنبوب للمعيار .

٢ – انقل ٠,٥ مل من الركيزة المدروءة في كل أنبوب واحضنها في حمام مائي (٣٧°س) لمدة ٥ دقائق .

٣ – أضِفْ ١٠٠ مكل من مصل المريض أو المصل الشاهد إلى أنابيب « الاختبار » ، أو ١٠٠ مكل ماء (كفيء الكاشف) ، أو ١٠٠ مكل بيروفات معياري (معيار) . امزج واحضن في درجة حرارة ٣٧°س .

٤ – بعد ٦٠ دقيقة بالضبط ، أضِفْ ٠,٥ مل من كاشف اللون إلى كل أنبوب ، ثم امزجها وأخرِجْها من الحمام المائي .

٥ – أضِفْ ١٠٠ مكل من مصل المريض أو المصل الشاهد إلى أنابيب كفيء العينة .

٦ – اترك الأنابيب مدة ٢٠ دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثم أضِفْ ٥,٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٤٠٠ ممول/ل) وامزج جيّداً .

٧ – اترك الأنابيب في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق على الأقل ولكن ليس أكثر من ٣٠ دقيقة ، ثم اقرأ التَماصّ بموجة طولها ٥٠٥ نم . اضبط صفر المقياس الطيفي بكفيء الكاشف .

٤–٦–٥ التعبير

في هذه الطريقة تُحسب كمية البيروفات المتشكّلة بمقارنة تماص (ص) العينات (تماص كفيء–الاختبار) مع تَماصّ البيروفات المعياري (٤ ممول/ل) . ولكن الألفا–كيتوغلوتارات

تساهم أيضاً في التَمَاصّ ، والتغير في التَمَاصّ لا يرتبط خطياً بنشاط الإنظيم المعبَّر عنه بالوحدات في اللتر (و/ل) ولذلك يجب استعمال الجدول لتحويل كمية البيروفات المتشكلة إلى و/ل .

٤-٦-٦ الحســاب

$$\text{كمية البيروفات المتشكلة} = \frac{(\text{ص اختبار} - \text{ص كفيء العينة} - \text{ص كفيء الكاشف})}{\text{ص المعيار} - \text{ص كفيء الكاشف}} \times \frac{٤\times١\times١٠٠٠}{٦٠}$$

(مكمول/دقيقة/ل)

$$= \frac{(\text{ص اختبار} - \text{ص كفيء العينة})}{\text{ص كفيء المعيار}} \times ٦٦,٧$$

مع ضبط صفر المقياس الطيفي على كفيء الكاشف بموجة طولها ٥٠٥ نم .

حيث : ص اختبار = تماص الاختبار

ص كفيء العينة = تماص كفيء العينة

ص المعيــار = تماص المعيار

استخدم الجدول التالي لتحويل كمية البيروفات إلى و/ل (معبراً عنها بالـ مكمول/دقيقة/ل في درجة الحرارة ٣٧°س) .

البيروفات المحسوبة (مكمول/دقيقة/ل)	نتيجة « الأسات » (و/ل في ٣٧°س)	البيروفات المحسوبة (مكمول/دقيقة/ل)	نتيجة « الأسات » (و/ل في ٣٧°س)
٢	٤	٢٨	٥٢
٤	٦	٣٠	٥٦
٦	١٠	٣٢	٦٠
٨	١٢	٣٤	٦٤
١٠	١٥	٣٦	٦٩
١٢	١٩	٣٨	٧٣
١٤	٢٣	٤٠	٧٧
١٦	٢٧	٤٢	٨١
١٨	٣١	٤٤	٨٥
٢٠	٣٥	٤٦	٩٢
٢٢	٤٠	٤٨	٩٨
٢٣	٤٢	٥٠	١٠٦
٢٤	٤٤	٥٢	١١٤
٢٦	٤٨	٥٤	١٢٥

ملاحظة : عندما يتعدى نشاط عينةٍ ما ١٢٥ و/ل ، يجب إعادة القياس مع الحضن مدة ١٠ دقائق (بدلاً من ٦٠ دقيقة) ، وتضرب النتيجة في ٦ . وعندما يكون النشاط أعلى من ٧٥٠ و/ل ، يجب تخفيف المصل ١ : ١٠ بمحلول كلوريد الصوديوم (١٥٠ ممول/ل) ويجب استعمال زمن الحضانة ١٠ دقائق ، وتُضرب النتيجة في ٦٠ .

٤-٦-٧ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ٨٪

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدى هذه القيمة ١٦٪ .

في كل دفعة من النماذج يجب إدراج نموذجين لمصلين شاهدين على الأقل ، لهما قيم معروفة تقع في المجال ٢٠-١٢٥ و/ل ويكون أحدهما غير معلوم لمنفذّ الاختبار . واذا كان التحليل يجرى على نماذج مفردة فيجب دائماً ضم نموذج شاهد .

٤-٦-٨ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية : تصل إلى ٤٢ و/ل

ملاحظة : في كثير من الاجراءات القديمة بمقياس اللون الأساس (SGOT) ، كانت القيم المرجعية تُربَط بطرائق الموجة فوق البنفسجية (٣٤٠ نم) في درجة الحرارة ٢٥°س وكانت تصل إلى حوالي ٢٠ و/ل .

وقد استعمل عامل تحويل لدرجة الحرارة قدره ٢,٠٨ لتحويل النتائج من ٢٥°س إلى ٣٧°س . [9] .

٤-٦-٩ المرجع

Reitman, S. & Frankel, S. (1957) **Am. J. Clin. Pathol., 28**, 56-63.

٤-٧ قياس بيكربونات المصل أو البلازما . بطريقة : المعايرة

قم بتوسيم عدد من الحواجل (أو الدوارق الصغيرة) يكفي لحوجلة المقارنة (ق) ، وحوجلات المعايير (م) ، وعينات المرضى (ر) . اعمل اختبارات (م) و (ر) مزدوجة .

ضع بالممص في الحواجل ما يأتي :

	ح م	م	ر
محلول ملحي ١٪ (مل)	٦,٠	٤,٠	٤,٠
عينات المرضى (مكل)	١٠٠	–	١٠٠
محلول بيكربونات معياري (مكل)	–	١٠٠	–
حمرة الفينول (مكل)	١٠٠	١٠٠	١٠٠
حمض الهدروكلوريك ، ١٠ ممول/ل (مل)	–	١,٠	١,٠

امزج جيداً واتركها مدة دقيقة واحدة على الأقل ، ثم عاير (م) و (ر) بسرعة بهيدروكسيد الصوديوم (١٠ ممول/ل) حتى يتناسب اللون مع لون (ق) .

احسب بيكربونات المُصل بالممول/ل . دوِّن متوسط المزدوجات .
تحقَّق أن قيمة المتوسط للمعايير تقع في المجال ٢٤-٢٦ ممول/ل

٤-٧ البيكربونات ، الطريقة : المعايرة

٤-٧-١ المبــدأ

تضاف كمية معروفة من حمض قوي إلى المصل الطازج أو البلازما الطازجة . يُهَزّ المزيج لطرد غاز ثاني أكسيد الكربون المتحرّر ثم يُعايَر الحمض المتبقي بقاعدة معيارية مع استعمال حمرة الفينول phenol red كمُشعِر indicator .

٤-٧-٢ الأجهزة والكيماويات

- الزجاجيات
  - سحاحة مكروية microburette ، مدرجة الى ٠,٠١ مل
  - سحاحة ١٠ مل
  - حواجل حجمية (١٠٠ مل ، ٥٠٠ مل ، ١ لتر)
  - حواجل ايرلنماير (٢٥ مل)

- ممصات حجمية (١٠٠ مكل)
- ممصات مدرّجة (١ مل و ١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
- قوارير للكواشف (بلاستيكية) بسدادات لولبية
- سخانة أو حراق بُنزن

- الكيماويات
- حمض الهدروكلوريك المركزّ (٣٧٪ وزن/حجم) **تحذير** : أكّال قوي
- حبيبات هيدروكسيد الصوديوم (درجة كاشف تحليلي)
- بيكربونات الصوديوم ، اللامائية
- كربونات الصوديوم
- كلوريد الصوديوم
- حمرة الفينول phenol red (صلب ذؤوب في الماء)
- برتقالي الميثيل methyl orange

٤-٧-٣ الكواشف

١ - **حمض الهدروكلوريك ، ١٠٠ ممول/ل** : ضع بالممص باحتراس مستعملاً كمثراة مطاطية ، ٩ مل من حمض الهدروكلوريك المركّز في حوجلة حجمية سعة لتر واحد وأكمِلْ الى اللتر بالماء المقطر .

٢ - **محلول كربونات الصوديوم ، ١٠٠ ممول/ل** : زن بدقة ١,٠٦ غ من كربونات الصوديوم وضَعْها في حوجلة حجمية سعة ١٠٠ مل وذوبّها وخففّها إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر .

ملاحظة : يجب معايرة محلول حمض الهدروكلوريك بمحلول كربونات الصوديوم على النحو التالي :
ضع ١٠,٠ مل من محلول كربونات الصوديوم (١٠٠ ممول/ل) في حوجلة ايرلنماير سعة ٢٥ مل . أضِفْ قطرتَيْن من محلول مشعر برتقالية لميثيل (٠,١٥ غ برتقالية الميثيل مذابة في ١٠٠ مل ماء) . عاير بمحلول حمض الهدروكلوريك (١٠٠ ممول/ل) من سحاحة سعة ١٠ مل حتى يتغير اللون من أصفر إلى برتقالي . وتحسب المولية molarity لمحلول حمض الهدروكلوريك HCl كما يلي : مولية HCl = $\frac{١٠ \times ١٠٠}{\text{حجم HCl المطلوب}}$ ممول/ل

اضبط موليَّة حمض الهدروكلوريك الى ١٠٠ ممول/ل بالضبط .

مثال : إذا وجد أن موليَّة حمض الهدروكلوريك هي ١٠٣ ممول/ل ، فانه يجب اضافة الماء المقطر إلى ٥٠٠ مل من حمض الهدروكلوريك لضبط موليتّه إلى ١٠٠ ممول/ل تماماً كما يتبين من المعادلة الآتية :

$$\frac{\text{حجم HCl} \times \text{المولِّية المقيسة}}{\text{المولِّية المطلوبة بالضبط}} = \text{حجم HCl بعد التخفيف بالماء}$$

ولهذا المثل أعلاه = $\frac{١٠٣ \times ٥٠٠}{١٠٠}$ = ٥١٥ مل

٣ – **ماء خالٍ من ثاني أكسيد الكربون** . يمكن تحضير الماء الخالي من ثاني أكسيد الكربون بغلي الماء المقطر عدة دقائق لطرد ثاني أكسيد الكربون . ثم يوضع الماء المغلي وهو لا يزال ساخناً في قارورة تُسَدّ بإحكام ثم يُخزن .

٤ – **محلول كلوريد الصوديوم ، ١٠ غ/ل (ملحي ١٪)** : ذوّب ١٠ غ من كلوريد الصوديوم في ١ لتر من الماء الخالي من ثاني أكسيد الكربون . ضع المحلول دون تأخير في وعاء ذي غطاء محكم السد .

٥ – **حمض الهدروكلوريك ١٠ ممول/ل** . خفِّف ١٠,٠ مل من حمض الهدروكلوريك (١٠٠ ممول/ل) إلى ١٠٠ مل من ملحي (١٪) خالٍ من ثاني أكسيد الكربون . ويجب حفظ هذا المحلول في قارورة مسدودة عند عدم استعماله . ويجب تحضيره كل يوم .

٦ – **محلول هيدروكسيد الصوديوم المشبع** . حضِّر بعناية ١٠٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم المشبع في ماء مقطر . ويلزم حوالي ٥٠ غ . (انظر التحذير في قسم السلامة الحيوية ١–٤) . دَعْ الكربونات ترسب ثم استعمل الطافي في تحضير المحلول المخزون ، ١٠٠ ممول/ل . يجب خزن المحلول المشبع في قارورة بلاستيكية ذات سدادة محكمة . وهو ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٧ – **محلول هيدروكسيد الصوديوم الخزين ، ١٠٠ ممول/ل** : خذ بالممص بحذر مستعملاً كمثراة مطاطية ٢,٧ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم المشبع وخفِّفها إلى ٥٠٠ مل بالماء الخالي من ثاني أكسيد الكربون . عاير المحلول مقابل ٤ مل من حمض الهدروكلوريك (١٠٠ ممول/ل) مع استعمال ١٠٠ مكل من مشعر حمرة الفينول . اضبط المحلول الى ١٠٠ ممول/ل بالضبط . اخزن هذا المحلول في قارورة بلاستيكية مسدودة بإحكام ، وجدِّده كل أسبوع .

٨ – **محلول هيدروكسيد الصوديوم الشغال ، ١٠ ممول/ل** . خفِّف ١٠,٠ من محلول هيدروكسيد الصوديوم الخزين (١٠٠ ممول/ل) إلى ١٠٠ مل من ملحي ١٪ خالٍ من ثاني أكسيد الكربون . تحقَّق من التركيز بحمض الهدروكلوريك (١٠ ممول/ل) باستعمال حمرة الفينول كمشعر . فإذا لم يكن التركيز صحيحاً ، حضِّر محلولاً خزيناً جديداً . ويجب حفظ المحلول الشغّال في قارورة مسدودة عند عدم استعماله ، كما يجب تحضيره كل يوم .

٩ – **مشعر حمرة الفينول** . ذوّب ٠,١ غ من حمرة الفينول في ٥,٧ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٥٠ ممول/ل) . ثم انقلها إلى حوجلة حجمية سعة ١٠٠ مل وخففها إلى حجم

الحوجلة بالماء الخالي من ثاني أكسيد الكربون . يجب خزن هذا المحلول في قارورة بلاستيكية مسدودة بإحكام ، وهو ثابت لمدة غير محدودة .

١٠- **محلول البيكربونات المعياري ، ٢٥ ممول/ل** . زن وزناً دقيقاً ٢١٠ مغ من بيكربونات الصوديوم الجافة وذوّبها في الماء الخالي من ثاني أكسيد الكربون وأكمل الى ١٠٠ مل في حوجلة حجمية .

ملاحظة : قد تجد بعض المختبرات أن من الأوفر اقتصادياً شراء محاليل مركزة حجمية من حمض الهدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم اللذين يمكن تخفيفهما الى ١٠ ممول/ل بالماء الخالي من ثاني أكسيد الكربون . ويجب أن تحضَّر المحاليل (١٠ ممول/ل) طازجة كل يوم .

٤-٧-٤ طريقة العمل

١ - ضع بالممص ٦,٠ مل من الملحي (١٪) في حوجلة ايرلنماير سعة ٢٥ مل . أضِفْ ١٠٠ مكل من العيّنة و ١٠٠ مكل من مشعر حمرة الفينول .

٢ - أدخِلْ سدادة مطاطية في الحوجلة ودوِّرْها برفق لمزج المحتويات . تُستعمل هذه الحوجلة للمقارنة (سوف تُتابع معايرة الاختبار إلى أن يثبت نفس اللون الذي في هذه الحوجلة) .

٣ - ضع بالممص ١٠٠ مكل من العينة في حوجلة ايرلنماير أخرى ، وأضِفْ ١,٠ مل حمض الهدروكلوريك (١٠ ممول/ل) ثم ٤ مل من الملحي (١٪) .

٤ - دوِّم swirl الحوجلة بقوة لمدة دقيقة على الأقل لطرد ثاني أكسيد الكربون .

٥ - أضف ١٠٠ مكل بالضبط من مشعر حمرة الفينول . ثم عاير بسرعة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم الشغال (١٠ ممول/ل) حتى يظهر لون قرنفلي يحاكى لون حوجلة المقارنة ويستمر لمدة حوالي ١٥ ثانية . سجل قراءة السّحاحة burettes (قرب نقطة النهاية يميل اللون الى التحوّل ثم يبهت بعد إضافة كل قطرة) . يجب عمل هذا الاختبار مزدوجاً .

٤-٧-٥ التعيير

قبل القيام بتحليل بيكربونات المصل أو البلازما ، تحقَّقْ من تركيز البيكربونات في محلول البيكربونات المعياري بنفس الطريقة الموصوفّة أعلاه بالضبط واستعمال المعايير يتيح التثبّت من قوة المحاليل الشغالة من الحمض والقلوي . ويجب أن تقع القيمة الملاحظة للمعيار في المجال ٢٤-٢٦ ممول/ل .

٤-٧-٦ الحساب

١,٠ - ص = ح ، حيث

ص = حجم هيدروكسيد الصوديوم المستعمل في المعايرة

ح = حجم حمض الهدروكلوريك (١٠ ممول/ل) المكافىء للبيكربونات في العينة
ح × ١٠٠ = بيكربونات المصل ، ممول/ل = (١ ميلي مكافىء/ل)

٤-٧-٧ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف حوالي ١٠٪

تباين الشروط الروتينية : يجب ألا تتعدى هذه القيمة ٢٠٪

٤-٧-٨ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية : ٢٣-٣١ ممول/ل

ملاحظـة : هذه الطريقة تعيِّن في الواقع تركيز البيكربونات وليس محتوى العينة من ثاني أكسيد الكربون الذي يكون عادة أعلى بحوالي ١,٣ ممول/ل في الأشخاص الأسوياء .

المرجـع :

Hodes, M.E. (1953) **Std. Methods Clin. Chem., 1,** 19-22

٨-٤ قياس اجمالي البليروبين في المصل أو البلازما . بطريقة جندراسيك - غروف Jendrassik-GROF

قم بتوسيم عدد من الأنابيب يكفي للدفقة ، وتشمل المعيار (م) ، والشواهد (ش١ ، ش٢) ، وعينات المرضى (١ ، ٢ ، ٣ ، الخ) . وكل هذه « للاختبارات » .

قم بتوسيم أنابيب « الكفيء » (ك) مقابل كل أنبوب من « الاختبار » أى ك م ، ك ش١ ، ك ش٢ ، ك١ ، ك٢ ، ك٣ ، الخ

ضع بالممص ما يلي :

	م	ك م	ش١،ش٢	ك ش١،ك ش٢	١،٢،٣، الخ	ك١،ك٢، الخ
كاشف الكافين البنزواتي (مل)	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠
المعيار ، ٣٤٢ مكمول/ل (مكل)	١٠٠	١٠٠	–	–	–	–
الشواهد (مكل)	–	–	١٠٠	١٠٠	–	–
عينة المريض (مكل)	–	–	–	–	١٠٠	١٠٠
كاشف الديازو (مل)	٠,٥	–	٠,٥	–	٠,٥	–
حمض السلفانيليك (مل)	–	٠,٥	–	٠,٥	–	٠,٥

امزج جيداً واترك الأنابيب في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٠ دقائق ثم أضف :

	م	ك م	ش١،ش٢	ك ش١،ك ش٢	١،٢،٣، الخ	ك١،ك٢، الخ
كاشف الطرطرات القلوي (مل)	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠

امزج جيداً واقرأ التَمَاصّ لكم ، لك ش ١ ، ك ش ٢ ، ك ١ ، ك ٢ ، ك ٣ ، الخ . ثم اقرأ التَمَاصّ م ، ش ١ ، ش ٢ ، ١ ، ٢ ، ٣ ، الخ .

مقياس اللون : مرشحة برتقالية ، إيلفورد ٦٠٧ (٦٠٠ نم)

المقياس الطيفي : ٦٠٠ نم

اضبط صفر الجهاز على الماء المقطر

احسب النتائج بالمكمول (مكروملل) / ل

تحقق من نتائج الشواهد

٤–٨ البليروبين . الطريقة : جندراسيك – غروف

٤–٨–١ المبـدأ

يتحد البليروبين الإجمالي بحمض السلفانيليك المُديَّز diazatized ، ويُعجّل التفاعل بوجود الكافين . وبعد إضافة قلوي قوي يقاس تماص الآزوبيليروبين azobilirubin الأزرق بموجة طولها ٦٠٠ نم . وانحلال الدم لا يتداخل في طريقة إجمالي البليروبين .

يعيّن البليروبين المقترن conjugated (المباشر) عن طريق التدييز diazotization في باهاء حمضية ، لا يتفاعل فيها البليروبين اللامقترن . ويلزم عمل كفيء لكل عينة مصل . وانحلال الدم يتداخل interferes في التحليل ويخفض البليروبين المقترن المقيس . وإضافة حمض الأسكوربيك تخفض آثار انحلال الدم إلى أقل ما يمكن .

٤–٨–٢ الأجهـزة والكيماويات

- الزجاجيات :
  - حواجل حجمية (بأحجام ١٠٠ مل ، ٥٠٠ مل ، و ١ لتر)
  - دوارق (١٠٠ مل ، و ١ لتر)
  - ممصات حجمية (٥٠ ، و ١٠٠ مكل)
  - ممصات مدرَّجة (١ مل ، و ١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - مخابير مدرجة (١٠٠ مل ، و ١ لتر)
  - أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
  - قوارير للكواشف (١٠٠ مل و ١ لتر)
  - كمثراة مطاطية
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٦٠٠ نم
- مقياس اللون ، مرشحة برتقالية ، إيلفورد ٦٠٧ (٦٠٠ نم)
- الكيماويات
  - مسحوق البليروبين (أو معايير بيليروبين تجارية)
  - كافين
  - بنزوات الصوديوم
  - أسيتات الصوديوم ، ثلاثية الهيدرات .
  - حمض السلفانيليك ؛
  - حمض الهدروكلوريك ، المركّز (٣٧٪ وزن/حجم) **تحذير** : أكّال قوي ؛

- نتريت الصوديوم ؛
- هيدروكسيد الصوديوم ، حبيبات ؛
- طرطرات البوتاسيوم والصوديوم ، رباعية الهيدرات ؛
- ايديتات الصوديوم ثنائية الهيدرات
- حمض الأسكوربيك ؛
- كربونات الصوديوم اللامائية .

٤-٨-٣ الكواشف

١ - **كاشف الكافين البنزواتي** . ذوّب ٩٣ غ من أسيتات الصوديوم الثلاثية الهيدرات ، و ٥٦ غ من بنزوات الصوديوم ، و ١ غ من الايديتات ، في حوالي ٥٠٠ مل من الماء . أضف ٣٨ غ من الكافين . ذوِّبْ وخفِّفْ إلى اللتر في حوجلة حجمية امزج جيداً ورشّح . هذا المحلول ثابت لمدة ٦ أشهر على الأقل في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢ - **كاشف حمض السلفانيليك** . أضف ٢,٥ غ من حمض السلفانيليك إلى حوالي ٢٠٠ مل من الماء المقطّر في حوجلة حجمية سعة ٥٠٠ مل . ضع بالممص بعناية مستخدماً كمثراة مطاطية ٧,٥ مل من حمض الهدروكلوريك المركّز في الحوجلة . ذوّب وأكمل إلى ٥٠٠ مل . هذا المحلول ثابت لمدة تصل الى ٦ أشهر في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٣ - **محلول نتريت الصوديوم** . ذوب ٥٠٠ مغ من نتريت الصوديوم sodium nitrite بالماء وأكمل إلى ١٠٠ مل . يجب خزن هذا المحلول في درجة حرارة ٢-٨°س ويجب تجديده كل شهر .

٤ - **كاشف الديازو** Diazo reagent . امزج ٤ مل من كاشف حمض السلفانيليك مع ٠,١ مل من محلول نتريت الصوديوم ، وانتظر على المزيج مدة دقيقتين ثم استعمله خلال ٥ ساعات . احفظه في درجة حرارة ٢-٨°س .

٥ - **كاشف الطرطرات القلوي** . ذوّب ٧٥ غ من هيدروكسيد الصوديوم ، و ٣٥٠ غ من طرطرات البوتاسيوم والصوديوم في حوالي ٨٠٠ مل من الماء . انقلها الى حوجلة حجمية وأكمل إلى اللتر . هذا المحلول ثابت لمدة ٦ أشهر على الأقل في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٦ - **حمض الهدروكلوريك ٥٠ ممول/ل** . ضع بممص بعناية مستخدماً كمثراة مطاطية ٤,٢ مل من حمض الهدروكلوريك (المركّز) ، وخففّه إلى اللتر بالماء المقطر ، وهذا مطلوب فقط لطريقة البليروبين المقترن .

٧ – **حمض الأسكوربيك ٤٠ غ/ل** . ذوّب ٠,٢ غ في ٥ مل من الماء . يجب تحضير هذا المحلول كل يوم . وهو مطلوب فقط لطريقة البليروبين المقترن .

٨ – **المصل الخالي من البليروبين** . اترك جميعة مصل في ضوء الشمس لمدة يوم واحد . لا تستعمل جميعة مصل أضيف اليها آزيد الصوديوم .

٩ – **كربونات الصوديوم ١٠٠ ممول/ل** . زن بدقة ١,٦ غ من كربونات الصوديوم اللامائية ، وانقلها كميًا إلى حوجلة حجمية سعة ١٠٠ مل تحتوي على ٥٠ مل من الماء المقطر . امزج جيداً وأكمل الى ١٠٠ مل بالماء المقطر .

١٠– **هيدروكسيد الصوديوم ١٠٠ ممول/ل** . زِنْ بسرعة ٢,٠ غ من هيدروكسيد الصوديوم في دورق . ذَوِّبها وأكمل الى ٥٠٠ مل بالماء المقطر .

١١– **محلول البيليروبين المعياري ٣٤٢ مكمول/ل** . زِنْ ٢٠ مغ من البليروبين (مسحوق أو بلورات) . وذوّبها في ٢,٠ مل من محلول كربونات الصوديوم (١٠٠ ممول/ل) ، و١,٥ مل هيدروكسيد الصوديوم (١٠٠ ممول/ل) . يجب أن يكون هذا المحلول أحمر ورائقاً . ويجب **عدم** تنفيذ هذا الإجراء في ضوء قوي .

انقل المحلول كمّياً إلى حوجلة حجمية سعة ١٠٠ مل ، أكمل إلى ١٠٠ مل بالمصل الخالي من البليروبين . اقسم المحلول إلى أحجام صغيرة واخزنها بالتجميد الشديد (–٢٠°س) .

اعمل على حماية المحلول من الضوء المباشر لأن البليروبين يتلفه الضوء بسرعة . ويمكن استخدام رقائق الألمنيوم أو ورق الكربون الأسود لتغليف الحوجلة الحجمية .

ويمكن أيضاً استعمال معايير البليروبين التجارية كمعايير في طريقة جندراسيك–غروف بل ربمّا كانت أكثر معوَّلية reliable من معايير البليروبين الموزونة في المختبر .

٤–٨–٤ طريقة العمل «لإجمالي البليروبين »

١ – ضع بالممص ١,٠ مل من كاشف الكافين البنزواتي في كلٍّ من أنبوبي اختبار وذلك للمعيار ولكل نموذج مريض أو شاهد . ويستعمل أنبوب واحد كفيء المعيار أو كفيء المصل وواحد للاختبار .

٢ – أضف ١٠٠ مكل من مصل المعيار أو المريض أو الشاهد إلى كل زوج من الأنابيب .

٣ – أضف ٠,٥ مل من كاشف الديازو الى الاختبار ، و ٠,٥ مل من حمض السلفانيليك الى الكفيء .

٤ – امزج جيّداً واترك الأنابيب مدة ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة .

٥ – أضف ١,٠ مل من كاشف الطرطرات القلوي إلى كل أنبوب وامزج جيداً .

٦ – اقرأ التَمَاصّ على موجة طولها ٦٠٠ نم (مرشحة إيلفورد رقم ٦٠٧) فوراً ، بعد ضبط صفر الجهاز بالماء المقطر .

ملاحظـة : يتم خفض الترحيل carry-over إلى الحدّ الأدنى بقياس التماص لجميع محاليل كفيء المصل أولاً ، وبعد ذلك لجميع محاليل الاختبار . واللون الأزرق للآزوبليروبين يبقى ثابتاً مدة حوالي ٣٠ دقيقة . وبعد هذه المدة قد يحدث عكر ويزيد تَمَاصّ كفيء المصل .

٤–٨–٥ طريقة العمل للبليروبين المقترن

١ – قم بتوسيم أنبوبين لكل نموذج مريض أو شاهد : واحد للاختبار والآخر للكفيء .
٢ – أضف ١٠٠ مكل من المصل إلى كل أنبوب .
٣ – أضف ١,٠ مل من حمض الهدروكلوريك (٥٠ ممول/ل) إلى كل أنبوب .
٤ – أضف ٠,٥ مل من كاشف ديازو إلى أنبوب « الاختبار » و٠,٥ مل من حمض السلفانيليك إلى أنبوب الكفيء . امزج جيداً .
٥ – بعد ٥ دقائق أضف ٥٠ مكل من محلول حمض الأسكوربيك إلى كل أنبوب .
٦ – أضف ١,٠ مل من كاشف الطرطرات القلوي إلى كل أنبوب . امزج جيداً واقرأ التَمَاصّ فوراً لكل محلول على موجة طولها ٦٠٠ نم ، بعد ضبط تَمَاصّ صفر الجهاز على الصفر بالماء المقطر .

٤–٨–٦ التعـيير

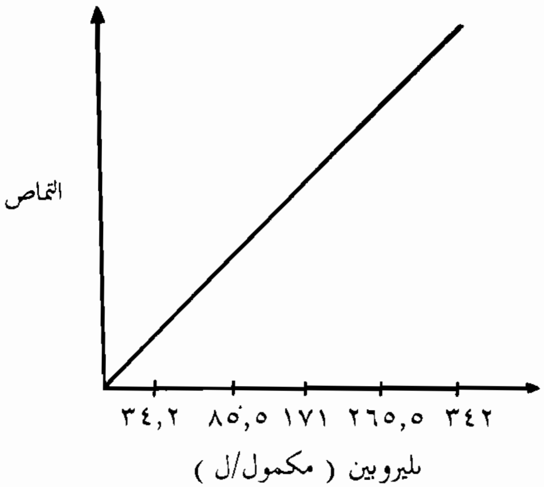
حضر محاليل بليروبين معيارية شغالة بتخفيف محلول البليروبين المعياري (٣٤٢ مكمول/ل) بالمصل الخالي من البليروبين كما هو مبيّن في الجدول أدناه . ويجب تحضير المحلول المعياري الشغال طازجاً كل مرة يعمل فيها مخطط تعيير calibration graph .

معيار البيليروبين الشغّال	(١)	(٢)	(٣)	(٤)	(٥)	(٦)
محلول معيار البليروبين، ٣٤٢ مكمول/ل (مل)	صفر	١	١	٢	٣	٤
المصل الخالي من البليروبين (مل)	٤	٩	٣	٢	١	صفر
تركيز محلول معيار البليروبين الشغال (مكمول/ل)	صفر	٣٤,٢	٨٥,٥	١٧١	٢٥٦,٥	٣٤٢

يحضَّر مخطط التعبير من معايير البليروبين الشغّالة باستعمال أحجام المعيار والكواشف الموصوفة في الجدول أدناه .

رقم الأنبـوب	١	٢	٣	٤	٥	٦
كاشف الكافين البنزواتي (مل)	كفيء ١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠
معيار البليروبين الشغّال (مكل)	(١) ١٠٠	(٢) ١٠٠	(٣) ١٠٠	(٤) ١٠٠	(٥) ١٠٠	(٦) ١٠٠
امزج ، وقم بحماية الأنابيب من الضوء ، ثم أضِفْ						
كاشف ديازو (مل)	صفر	٠,٥	٠,٥	٠,٥	٠,٥	٠,٥
امزج جيداً واترك المحاليل في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٠ دقائق . مع حماية الأنابيب من الضوء						
كاشف حمض السلفانيليك (مل)	٠,٥	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر
امزج جيداً						
كاشف الطرطرات القلوي (مل)	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠	١,٠
امزج جيداً . اقرأ التَمَاصّ لكل أنبوب على موجة طولها ٦٠٠ نم بعد ضبط صفر الجهاز بمحلول الكفيء (الأنبوب رقم ١)						

ضع تَمَاصّ كل أنبوب على المحور العمودي مقابل تراكيز محاليل المعايير الشغّالة بالمكمول/ل على المحور الأفقي ، كما يلي :



وعندما يثبت أن مخطط التعيير خطّي على مقياسك الطيفي ، فسوف تحتاج الى بليروبين معياري واحد فقط ، رقم ٦ (٣٤٢ مكمول/ل) لتحليله مع كل دفعة من عيّنات المرضى . ويجب تحضير مخطط التعيير مرة كل شهر على الأقل .

٤-٨-٧ الحســاب

اذا كان مخطط التعيير خطيّاً ، احسب النتائج باستعمال المعادلة التالية :

$$\text{تركيز البليروبين (مكمول/ل)} = \frac{\text{ص} - \text{ك ص}}{\text{م} - \text{ك م}} \times ٣٤٢$$

حيث ص = قراءة تماص العينة أو الشاهد

ك ص = قراءة تماص كفيء العينة أو الشاهد

م = قراءة تماص معيار البليروبين (٣٤٢ مكمول/ل)

ك م = قراءة تماص كفيء المعيار

٤-٨-٨ ضـمان الجـودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ٦٪

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدى هذه القيمة ١٢٪

مع كل دفعة من النماذج يجب إدراج نموذجين من مصلين شاهدين على الأقل لهما قيم معروفة تقع في المجال ٢٠-٢٠٠ مكمول/ل ، ويجب أن يكون أحدهما غير معلوم للفاحص . وعند تحليل نماذج مفردة يجب دائماً ضم نموذج شاهد .

٤-٨-٩ القيم المرجعية لاجمالي البليروبين

للبالغين : ٣-٢١ مكمول/ل

وللتحويل من وحدات النظام الدولي SI إلى الوحدات « القديمة » :

مكمول/ل × ٠,٠٥٨٥ = مغ/ ١٠٠ مل .

٤-٨-١٠ المرجع : [13]

٤-٩ قياس الكلسيوم في المصل أو البلازما . الطريقة : كومبلكسون كريزول فثالين o-cresolphthalein complexone

تحقق من تَمَاصّ كاشف كومبلكسون كريزول فثالين الشغّال أولاً

مقياس اللون : مرشحة صفراء ، إيلفورد ٦٠٦ (٥٨٠ نم)

المقياس الطيفي : ٥٧٥ نم

اضبط صفر الجهاز بالماء المقطر . وقس تَمَاصّ كاشف الكومبلكسون الشغّال فاذا كان أعلى من ٠,٢ ، وَجَب تحضير كاشف كومبلكسون شغّال طازج

قم بتوسيم عدد من الأنابيب يكفي لكفيء الكاشف (ك) ، والمعيار (م) والشواهد (ش١ ، ش٢) وعينات المرضى (١،٢،٣، الخ)

ضع بالممص في الأنابيب ما يأتي :

	ك	م	ش١، ش٢	١،٢،٣، الخ
كاشف الكومبلكسون الشغّال (مل)	٥,٠	٥,٠	٥,٠	٥,٠
ماء مقطر (مكل)	٥٠	—	—	—
معيار كلسيوم ، ٢,٥ ممول/ل (مكل)	—	٥٠	—	—
شاهد أو عينة مريض (مكل)	—	—	٥٠	٥٠

امزج جيداً وقِسْ التَمَاصّ

مقياس اللون : مرشحة صفراء ، إيلفورد ٦٠٦ (٥٨٠ نم)

المقياس الطيفي : ٥٧٥ نم

اضبط صفر الجهاز بالماء المقطّر

احسب النتائج بالممول/ل : اكتب في التقرير متوسط المزدوجات .

تحقق من نتائج الشواهد .

٤-٩ الكلسيوم . الطريقة : كومبلكسون كريزول فثالين

٤-٩-١ المبـدأ

يقاس كلسيوم المصل أو البلازما بكاشف كومبلكسون كريزول فثالين يحتوي على الايثانديول الذي يبقي على المحلول رائقاً في وجود البروتينات ويكبت تأيّن الكومبلكسون كريزول فثالين في الكاشف . ويتم منع تداخل المغنزيوم بإضافة ٨-هيدروكسي كينولين 8-hydroxyquinoline .

٤-٩-٢ الأجهزة والكيماويات

- الأواني الزجاجية :
  - حواجل حجمية (بأحجام ١٠٠ مل ، ٥٠٠ مل ، ١ لتر)
  - ممصات حجمية (٥٠ مكل ، ٢٠٠ مكل ، ٥ مل ، ١٠ مل)
  - ممصات مدرّجة (١ مل ، ٢ مل ، ١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - دوارق (٢٥٠ مل)
  - مخابير مدرجة (٥٠ مل)
  - أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)

ملاحظة : يجب تنظيف جميع الزجاجيات تنظيفاً جيداً ، ثم تنقع طوال الليل في حمض الهدروكلوريك (٠,٥ مول/ل) لإزالة آثار الكلسيوم ، ثم تشطف جيداً بماء مقطر أو منزوع الشوارد ، ثم أخيراً تجفف قبل الاستعمال .

  - بصيلة سلامة safety bulb للممصات
  - مقياس طيفي ، طول الموجة ٥٧٥ نم
  - مقياس اللون ، مرشحة صفراء ، إيلفورد ٦٠٦ (٥٨٠ نم)
- الكيماويات :
  - حمض الهدروكلوريك ، المركز (٣٧٪ وزن/حجم) **تحذير** : أكّال قوي
  - كومبلكسون كريزول فثالين
  - ايثانديول ، درجة تحليلية
  - ٢-امينو-٢-ميثيل-١-بروبانول
  - ٨-هيدروكسي كينولين ، درجة تحليلية
  - كربونات الكلسيوم ، درجة تحليلية

٤-٩-٣ تحضير الكواشف

١ - **حمض الهدروكلوريك ، حوالي ٠,٥ مول/ل** . خفف - باضافة الحمض الى الماء - حوالي ٤٥ مل من حمض الهدروكلوريك (المركّز) إلى لتر واحد من الماء المقطر . استعمل هذا المحلول في نقع الزجاجيات كما هو موصوف في الفقرة ٤-٩-٢ (الملاحظة) .

٢ - **كاشف الكومبلكسون كريزول فتالين الخزين** : أضِفْ ٣٨ مل ايثانديول و ١٣ مل من ٢-أمينو-٢ ميثيل-١-بروبانول إلى حوالي ٤٠٠ مل من الماء المقطر في حوجلة حجمية سعة ٥٠٠ مل . زن حوالي ١٥ مغ من كومبلكسون كريزول فثالين وأضِفها إلى الحوجلة الحجمية . ذوّب وأكمل إلى العلامة بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت مدة ٣ أسابيع في درجة حرارة ٤-٦°س .

٣- **كاشف الكومبلكسون كريزول فتالين الشغّال** . زن ١٠٠ مغ من ٨-هيدروكسي كينولين وأضِفْ اليها ١٠٠ مل من كاشف الكومبلكسون الخزين . يذوّب ٨-هيدروكسي كينولين ببطء شديد . هذا المحلول ثابت لمدة أسبوع في درجة حرارة ٤-٦°س ، ويجب أن يكون له تماص بموجة ٥٧٥ نم يقرب من ٠,٢ عندما يقاس على مقياس طيفي ضبط صفره على الماء المقطر . ويدل التماص الأعلى من ٠,٢ إلى أن الكاشف قد تلف أو قد تلوث بالكلسيوم .

٤ - **معيار الكلسيوم الخزين ، ٢٥ ممول/ل** . جفّف حوالي ٣٠٠ مغ من كربونات الكلسيوم في وعاء جاف في فرن بدرجة حرارة ٨٠-١٠٠°س لمدة ٤ ساعات . وبعد التسخين أخرجها من الفرن وَسُدّ الوعاء بغطاء فوراً . وبعد أن تبرد إلى درجة حرارة الغرفة ، زن ٢٥٠ مغ بالضبط وضَعْها في حوجلة حجمية بسعة ١٠٠ مل . ذوّب كربونات الكلسيوم في أدنى حجم ممكن من حمض الهدروكلوريك (المركز) ، يلزم حوالي ٠,٥ مل ، ثم أكمِلْ الى ١٠٠ مل بالماء المقطر .

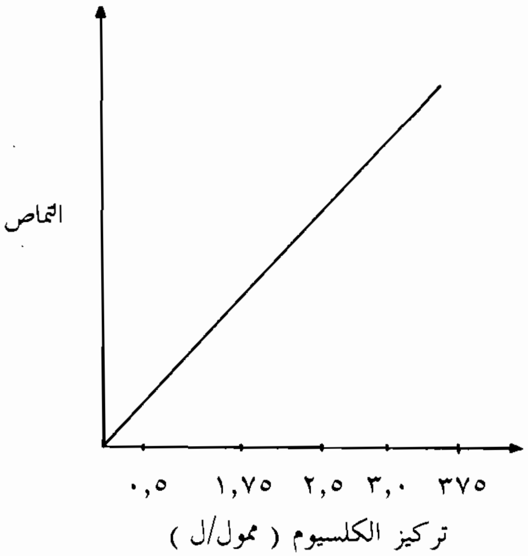
٥ - **معيار الكلسيوم الشغّال ٢,٥ ممول/ل** . انقل بممص حجمي ١٠,٠ مل من المعيار الخزين إلى حوجلة حجمية سعة ١٠٠ مل . أكمِلْ الى ١٠٠ مل بالماء المقطر .

٤-٩-٤ تحضير مخطط التعيير

يجب تحضير مخطط للتعيير لكي يتم التثبت من خطّية الطريقة ، ويجب التحقق منه مرة كل شهر . ويجب عدم استعمال مخطط التعيير لحساب نتائج المرضى . حضِّر معايير مخطط التعيير من معيار الكلسيوم الخزين كما هو موصوف في الجدول أدناه في أنابيب بأقصى دقة ممكنة باستعمال ممصات مدرّجة ١ و ٢ و ١٠ مل .

	رقم الانبــوب				
	١	٢	٣	٤	٥
معيار الكلسيوم الخزين ، ٢٥ ممول/ل (مل)	٠,٢	٠,٧	١,٠	١,٢	١,٥
ماء مقطر (مل)	٩,٨	٩,٣	٩,٠	٨,٨	٨,٥
تركيز الكلسيوم (ممول/ل)	٠,٥	١,٧٥	٢,٥	٣,٠	٣,٧٥

ضع ٥٠ مكل من الماء المقطر في أنبوب اختبار نظيف لكفيء الكاشف ، وضع ٥٠ مكل من كل من معايير مخطط التعيير في ٥ أنابيب اختبار أخرى . أضف ٥,٠ مل من كاشف الكومبلكسون كريزول فتالين الشغال إلى كل أنبوب مستخدماً ممصاً حجمياً سعة ٥ مل وبصلة سلامة للمص . امزج وقِسْ تَماصّ كل أنبوب بموجة طولها ٥٧٥ نم بعد ضبط صفر الجهاز بالماء . ضع تماصّ كل أنبوب على المحور العمودي مقابل تركيز الكلسيوم في معايير المخطط بالممول/ل على المحور الأفقي .



الغرض من تحضير مخطط التعيير هو التثبت من خطِّية الطريقة . فاذا كان هذا الرسم غير خطّي بعد ٣,٠ ممول/ل ، فانه يجب تخفيف عينات المرضى التي بها تراكيز كلسيوم أعلى من ٣,٠ ممول/ل ، ضعفين بالماء المقطر قبل التحليل . واذا كان المخطط خطيّاً حتى أعلى معيار لمخطط التعيير (أي ٣,٧٥ ممول/ل) فانه يجب تخفيف العينات التي بها تراكيز كلسيوم أعلى من ٣,٧٥ ممول/ل ضعفين بالماء المقطر قبل التحليل .

٤-٩-٥ طريقة العمل

١ - يجب اجراء التحليل مزدوجاً . انقل ٥٠ مكل من المصل أو البلازما الى كل من أنبوبين نظيفين . وأضِفْ ٥,٠ مل من كاشف الكومبلكسون الشغّال إلى كل أنبوب ، وامزج .
٢ - انقل ٥٠ مكل من معيار الكلسيوم الشغّال (٢,٥ ممول/ل) الى كل من أنبوبين نظيفين . وأضِفْ ٥,٠ من كاشف الكومبلكسون الشغّال إلى كل أنبوب ، وامزج .
٣ - انقل ٥٠ مكل من الماء المقطر إلى أنبوب نظيف . وأضِفْ ٥,٠ مل من كاشف الكومبلكسون الشغال ، وامزج . هذا هو كفيء الكاشف .
٤ - اضبط صفر المقياس الطيفي بالماء المقطر بموجة طولها ٥٧٥ نم ، وقِسْ تَمَاصّ كفيء الكاشف الذي يجب أن يكون حوالي ٠,٢ .
٥ - قِسْ تماص المعيارَيْنْ (٢,٥ ممول/ل) وعينات المصل .

إذا كانت قراءات التماص المزدوجة تختلف بأكثر من ٠,٠١٥ ، كانت الدقة غير مقبولة . تحقَّقْ من أن أنابيب الاختبار والممصات نظيفة (انظر الفقرة ٤-٩-٢) . وتحقَّقْ من دقة الممص الحجمي سعة ٥٠ مكل . استعمل ممصاً حجمياً سعة ٥ مل لكاشف الكومبلكسون الشغال . تحقَّقْ من أن كفيتات cuvettes (خلايا) المقياس الطيفي نظيفة .

٤-٩-٦ الحساب

احسب النتائج باستعمال المعادلة التالية :

$$\text{تركيز الكلسيوم} = \frac{\text{ص ع} - \text{ص ك}}{\text{م} - \text{ص ك}} \times ٢,٥$$

حيث ص ع= قراءة تماص العينة أو الشاهد
ص ك= قراءة تماص كفيء الكاشف
م = قراءة تماص معيار الكلسيوم الشغال

واذا كانت نتيجة العينة أو الشاهد أعلى من خطيِّة linearity الطريقة (انظر الفقرة ٤-٩-٤) ، أعِدْ التحليل بعد تخفيف ٢٠٠ مكل من العينة مع ٢٠٠ مكل من الماء المقطر بدقة في أنبوب نظيف . استعمل ٥٠ مكل من العينة المخففة للتحليل . تذكَّرْ أن تضرب النتيجة في ٢ للحصول على تركيز الكلسيوم في العينة .

٤-٩-٧ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب إمكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ١,٥٪

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدّى هذه القيمة ٤٪ .

مع كل دفعة من النماذج يجب إدراج نموذجين من مصلين شاهدين على الأقل لهما قيم معروفة تقع في المجال ٢,٠-٢,٩ ممول/ل ، ويجب أن يكون احدهما غير معلوم للفاحص . وعند تحليل نماذج مفردة يجب دائماً ضم نموذج شاهد .

٤-٩-٨ القيم المرجعية

المجال المرجعي للبالغين الأصحاء السائرين هو ٢,٢٥-٢,٦ ممول/ل . وللتحويل من وحدات النظام الدولي إلى الوحدات « القديمة » : ممول/ل × ٤ = مغ/١٠٠ مل .

والقيم المرجعية صالحة فقط عندما يكون لدى المريض تركيز سوي من ألبومين المصل . فإذا كان لدى المريض ألبومين مصلي منخفض ، فقد يكون من المفيد أن يذكر في التقرير الكلسيوم المصحّح بالألبومين فضلاً عن الكلسيوم المقيس في التقرير . ويتم حساب الكلسيوم المصحح بالألبومين بهذه الطريقة :

$$\frac{(\text{٤٠} - \text{ألبومين المريض})}{\text{٤٠}} + \text{الكلسيوم المقيس} = \text{الكلسيوم المصحح بالألبومين}$$

مثلاً ، إذا كان لدى المريض ألبومين ٢٠ غ/ل ، والكلسيوم المقيس ١,٩ ممول/ل ، يكون الكلسيوم المصحح بالألبومين ٢,٤ ممول/ل ، أي

$$\frac{(\text{٤٠} - \text{٢٠})}{\text{٤٠}} + \text{١,٩} = \text{١,٩} + \text{٠,٥} = \text{٢,٤} \text{ ممول/ل}$$

وسوف يكون الكلسيوم المصحح بالألبومين حوالي ٢,٢ - ٢,٦ ممول/ل عندما يكون انخفاض الكلسيوم المقيس نتيجة لانخفاض للالبومين المصلي .

٤-٩-٩ المرجع

Clark, W.L., Baginski, E.S., Marie, S.S. & Zak, B. (1975) **Microchem. J., 20** 22-32.

ملاحظة : إن تقدير الكلسيوم صعب ، خصوصاً بسبب امكان التلوث بالكلسيوم . فمن الضروري استعمال كيماويات عالية الجودة واتباع التوصيات المتعلقة بتنظيف الزجاجيات بكل دقة . وقد يكون من المفيد الاحتفاظ بأنابيب اختبار وممصات ، الخ مخصّصة لتحليل الكلسيوم فقط .

وعند تحضير الكواشف . كن حريصاً على عدم تلويث الكيماويات والزجاجيات الأخرى بكربونات الكلسيوم .

ويجب دائماً ادراج عينات لضمان الجودة للتحقق من دقة النتائج .

٤-١٠ قياس الكرياتينين في المصل/المصورة . الطريقة : تفاعل جافي Jaffe reaction

قم بتوسيم عدد من الأنابيب يكفي للدفعة وتشتمل على كفيء الكاشف (ك) ، والمعيار (م) ، والشواهد (ش١ ، ش٢) ، وعينات المرضى (١،٢،٣، الخ .

حضِّر كمية كافية من كاشف الكرياتينين الشغّال

ضع بالممص في الأنابيب ما يأتي :

	ك	م	ش١،ش٢	١،٢،٣، الخ
ماءً مقطراً (مكم)	٢٠٠	–	–	–
المعيار ، ٥٠٠ مكمول/ل (مكل)	–	٢٠٠	–	–
شواهد (مكل)	–	–	٢٠٠	–
عينة المريض (مكل)	–	–	–	٢٠٠
كاشف الكرياتينين الشغال (مل)	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠

امزج الأنابيب جيداً واتركها في درجة حرارة الغرفة لمدة ٩٠ دقيقة

مقياس اللون : مرشحة زرقاء–خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٣ (٤٩٠ نم)
مقياس طيفي : ٤٩٠ نم
اضبط صفر الجهاز بكفيء الكاشف ، ثم أعِدْ محلول كفيء الكاشف الى الأنبوب ك .

اقرأ تَمَاصّ كل أنبوب (القراءة ١) ، تذكر أن تعيد كل محلول إلى الأنبوب الخاص به بعد قياس التَمَاصّ .

أضِفْ ٥٠ مكل من حمض الأسيتيك ٦٠٪ إلى كل أنبوب ، وامزجها جيداً ودعها مدة ٦ دقائق في درجة حرارة الغرفة ، ثم اقرأ تَمَاصّ كل أنبوب مرة ثانية (القراءة ٢) . اضبط صفر الجهاز بالأنبوب ك .

احسب التَمَاصّ المصحّح لكل أنبوب (القراءة ١ – القراءة ٢) .

احسب النتائج بالمكمول/ل تحقق من نتائج الشواهد .

ملاحظة : حضِّر الأنابيب في أزواج اذا كنت ستستعمل جهازاً بخلية جريان flow-through راجع الإجراء من أجل التفاصيل .

٤-١٠ الكرياتينين . الطريقة : تفاعل جافي

٤-١٠-١ المبـدأ

يُمزج المصل أو البلازما بكاشف البيكرات picrate القلوي الذي يكوِّن مع الكرياتينين مركباً أصفر-أحمر . ويقاس تماص هذا المركب بموجةٍ طولها ٤٩٠ نم . والقيام بقراءة ثانية للتماص بعد تحميض المحلول يصحّح ما ينتج من مولِّدات اللون اللاكرياتينية في العينة .

٤-١٠-٢ الأجهزة والكيماويات

- الزجاجيات
  - حواجل حجمية (بأحجام ١٠٠ مل ، ٥٠٠ مل)
  - ممصات حجمية (٥٠ ، ٢٠٠ مكل)
  - ممصات مدرّجة (١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - مخابير مدرّجة
  - دوارق (٥٠٠ مل)
  - أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
  - قوارير للكواشف (٥٠٠ مل)
  - بصلة مطاطية للمص
- مقياس باهاء pH meter
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٤٩٠ نم
- مقياس اللون ، مرشحة زرقاء-خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٣ (٤٩٠ نم)
- الكيماويات :
  - سلفات دوديسيل الصوديوم (سلفات لوريل الصوديوم)
  - فسفات ثلاثية الصوديوم ($Na_3PO_4.12H_2O$)
  - رباعي بورات ثنائية الصوديوم (بوراكس) $Na_2B_4O_710H_2O$
  - هيدروكسيد الصوديوم ، حبيبات
  - حمض البكريك . **ملاحظة** : يضاف الماء إلى حمض البكريك لضمان السلامة أثناء النقل
  - حمض الأسيتيك ، الجَمُودُ . **تحـذير** : سائل أكّال قوي .
  - دوراي‍ء معيارية لمقياس الباهاء
  - كرياتينين ، لا مائي ، نقي .
  - حمض الهدروكلوريك ، المركز (٣٧٪ وزن/حجم) تحذير : أكّال قوي
  - حمض البنزويك .

٤-١٠-٣ الكواشـف

١ - **محلول هيدروكسيد الصوديوم ١ مول/ل** . زن ٢٠ غ من هيدروكسيد الصوديوم وذوّبها وأكمل إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطّر . اخزنها في قارورة من عديد الاثيلين مسدودة بإحكام . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢ - **كاشف الكرياتينين أ** . ذوّب ٢٠ غ من سلفات دوديسيل الصوديوم في ماء مقطر وخفّفه إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطّر . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة الغرفة ، ولكن يجب طرحه عندما يصير عكراً .

٣ - **محلول حمض البكريك المشبع** . (١٣ غ حمض البكريك في اللتر) . يأتي حمض البكريك Picric acid كمادة كيميائية رطبة . ولهذا يكون من الصعب وزن كمية دقيقة منه . تأكد من أن حمض البكريك وماءه - كما وصلك - ممزوجان جيداً ، ثم زن ما يكافيء ٧ غ من حمض البكريك ، أي حوالي ١١ غ إذا كان وعاء حمض البكريك عليه ما يفيد بأن ٥٠٪ من وزنه ماءً قد أضيف اليه . أضف ١١ غ من حمض البكريك الرطب إلى ٥٠٠ مل من الماء المقطر . حرِّك المزيج عدة ساعات للتأكد من الوصول إلى محلول مشبع ، ثم ضعه في قارورة كاشف قاتمة . هذا المحلول ثابت مدة غير محدودة في درجة حرارة الغرفة . **ملاحظة** : تتوقف كمية حمض البكريك الموزونة على الماء المحتوى في المادة الكيميائية التي لديك .

٤ - **كاشف الكرياتينين ب** . ذوّب ٩,٥ غ من الفسفات ثلاثية الصوديوم و ٩,٥ غ من رباعي بورات ثنائية الصوديوم في حوالي ٣٠٠ مل من الماء المقطر في دورق سعة ٥٠٠ مل . اضبط الباهاء إلى ١٢,٨ باضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم (١ مول/ل) ، وسوف يلزم حوالي ١١٠ مل . انقل المحلول إلى حوجلة حجمية سعة ٥٠٠ مل وأكمل إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة الغرفة .

٥ - **كاشف الكرياتينين ج** . خفف ١٧٥ مل من حمض البكريك المشبع إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لمدة ٣ أشهر في درجة حرارة الغرفة عند تخزينه في وعاء قاتم .

٦ - **كاشف الكرياتينين الشغّال** . امزج أحجاماً متساوية من كواشف الكرياتينين أ و ب و ج بحيث تحصل على كاشف شغال يكفي ليوم واحد . ويجب تحضير هذا المحلول قبيل الاستعمال وينبغي طرح ما يتبقّى منه .

٧ - **حمض الأسيتك ٦٠٪** . خفّف ٦٠ مل من حمض الاسيتيك الجَمُود (تحذير : أكال) إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر في مخبار حجمي . انقل المحلول إلى قارورة كاشف صغيرة . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٨ - **حمض الهدروكلوريك ١٠٠ ممول/ل** . خذ بالممص بعناية ، مستخدماً بصلة مطاطية ، ٤,٥ مل من حمض الهدروكلوريك (المركز) وخفّفها إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر .

٩ – **معيار الكرياتينين الخزين ١٠ مmol/ل** . ذوّب ٠,١١٣ غ من الكرياتينين (اللامائي) أو ٠,٣٦٢ غ من هيبوكلوريت الكرياتينين والزنك في حجم صغير من حمض الهدروكلوريك (١٠٠ مmol/ل) في دورق . انقل المحلول كمياً إلى حوجلة حجمية سعة ١٠٠ مل ، وأكمل إلى ١٠٠ مل بحمض الهدروكلوريك (١٠٠ مmol/ل) هذا المحلول ثابت لمدة شهرين في درجة حرارة ٢–٨°س .

١٠– **محلول حمض البنزويك ١ غ/ل** . ذوّب ١ غ من حمض البنزويك في ماء مقطر وأكمل إلى اللتر بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

١١– **معيار الكرياتينين الشغال ٥٠٠ مكمول/ل** . ضع ٥,٠ مل من معيار الكرياتينين المخزون في حوجلة حجمية وأكمِلْ إلى ١٠٠ مل بمحلول حمض البنزويك ١ غ/ل هذا المحلول ثابت لمدة شهرين في درجة حرارة ٢–٨°س .

٤–١٠–٤ التعيير

حضِّر مخططاً للتعيير كما هو مبين في الجدول أدناه للتثبت من مدى خطِّيَّة الطريقة على مقياسك الطيفي .

رقم الحوجلة الحجمية سعة ١٠٠ مل	١	٢	٣	٤	٥
معيار الكرياتينين الخزين ١٠ مmol/ل (مل) محلول حمض البنزويك ١ غ/ل	١,٠ أكمل إلى	٢,٠	٣,٠ ١٠٠	٤,٠ مل	٥,٠
تركيز الكرياتينين (مكمول/ل)	١٠٠	٢٠٠	٣٠٠	٤٠٠	٥٠٠

تحضير مخطط التعيير : حضِّر الأنابيب كما هو موصوف أدناه ، واطرح تَمَاصّ الأنبوب ٢ من كل زوج من تماص الأنبوب ١ .

١ – قم بتوسيم أنبوبين لكل من كفيء الكاشف (ك١ ، ك٢) وكل معيار (م١ ، ١ ؛ م١ ، ٢ ؛ م٢ ، ١ ؛ م٢ ، ٢ ؛ الخ) .

٢ – أضف ٢٠٠ مكل من الماء الى كل من أنابيب كفيء الكاشف و ٢٠٠ مكل من المعايير إلى كل زوج من الأنابيب .

٣ – أضف ٢,٠ مل من كاشف الكرياتينين الشغّال إلى كل أنبوب وامزج جيداً .

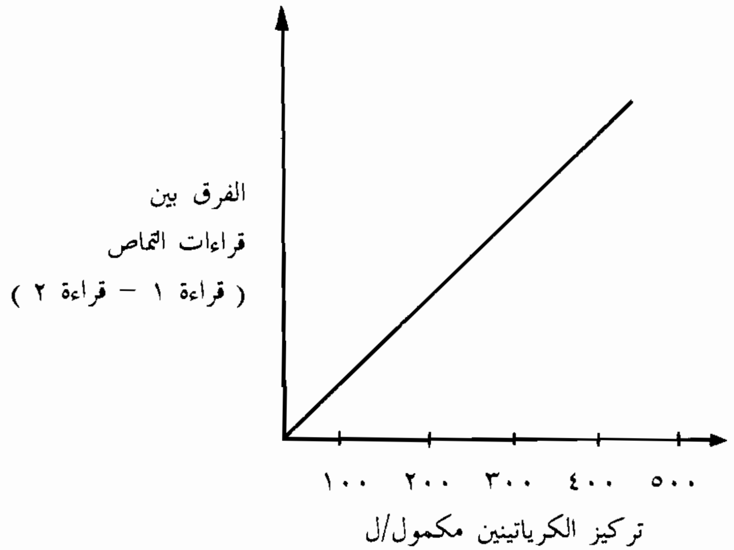
٤ – اتركها ٩٠ دقيقة في درجة حرارة الغرفة .

٥ – اقرأ التماص بموجة طولها ٤٩٠ نم (مرشحة زرقاء–خضراء ، إيلفورد ٦٠٣) للأنابيب الأولى من كل زوج (م١ ، ١ ؛ م٢ ، ١ الخ) بعد ضبط صفر الجهاز بالأنبوب ك١ .

٦ – أضف ٥٠ مكل من حمض الأسيتيك ٦٠٪ الى الأنبوب الثاني من كل زوج بما فيها الأنبوب ك٢ . امزجها واتركها ٦ دقائق في درجة حرارة الغرفة .

٧ – اقرأ التماص بموجة طولها ٤٩٠ نم (مرشحة زرقاء–خضراء ، إيلفورد ٦٠٣) للأنبوب الثاني من كل زوج (م١ ، ٢ ؛ م٢ ، ٢ ، الخ) بعد ضبط صفر الجهاز بالأنبوب ك٢ .

اطرح قراءة التماص للأنبوب الثاني من كل زوج من قراءة التماص للأنبوب الأول وضع النواتج على المخطط مقابل تركيز الكرياتينين كما هو مبين أدناه .



وعندما يكون قد ثبت أن الطريقة خطِّية الى ٥٠٠ مكمول/ل على الأقل في مقياسك الطيفي ، فلا حاجة إلى قياس معيار ٥٠٠ مكمول/ل مع كل دفعة من عينات المرضى . ولكن يجب تحضير مخطط التعيير مرة كل شهر على الأقل .

٤–١٠–٥ طريقة العمل

١ – حضِّر كمية من كاشف الكرياتينين الشغّال تكفي لعدد المعايير والضوابط وعينات المرضى المطلوب تحليلها ، وذلك بمزج أحجام متساوية من الكاشف أ ، والكاشف ب ، والكاشف ج . ويكون المخبار من سعة ٥٠ مل أو ١٠٠ مل على درجة كافية من الدقة .

٢ – ضع بالممص ٢,٠ مل من كاشف الكرياتينين الشغّال في كل أنبوب ، وأضِفْ ٢٠٠ مكل من الماء (كفيء الكاشف ، أو ٢٠٠ مكل من المعيار (٥٠٠ مكمول/ل) أو ٢٠٠ مكل من عيّنات المرضى أو الشواهد ، وامزج جيداً .

٣ – اتركها ٩٠ دقيقة في درجة حرارة الغرفة .

٤ - قِسْ التَمَاصّ بموجة طولها ٤٩٠ نم (مرشحة زرقاء-خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٣) بعد ضبط صفر الجهاز على كفيء الكاشف . احتفظ بالمحلول بعد قراءة التماص .

٥ - أضف ٥٠ مكل من حمض الأسيتيك ٦٠٪ إلى كل أنبوب ، وامزج جيداً .

٦ - اترك الأنابيب لمدة ٦ دقائق واقرأ التماصات لكل أنبوب مرة أخرى ، بعد ضبط صفر المقياس الطيفي على كفيء الكاشف .

ملاحظة : إذا استعملت مقياس اللون أو مقياساً طيفياً بخلية جريان flow-through cell ، فعليك أن تعدل طريقة العمل على النحو التالي :

(أ) قم بتوسيم أنابيب مزدوجة لكفيء الكاشف والمعيار وعينات الشواهد والمرضى .

(ب) اتبع طريقة العمل الموصوفة أعلاه في الخطوتين ٢-٣ . وبعد نهاية مدة ٩٠ دقيقة (الخطوة ٣) قس التَمَاصّ لأنبوب واحد من كل زوج من المزدوجات (القراءة ١) ، بعد ضبط الجهاز على الصفر مع كفيء الكاشف .

(ج) أضف ٥٠ مكل من حمض الأسيتيك ٦٠٪ الى الأنابيب الأخرى من كل زوج من المزدوجات وامزجها واتركها لمدة ٦ دقائق . ثم قِسْ التَمَاصّ لكل أنبوب (القراءة ٢) بعد ضبط صفر الجهاز على كفيء الكاشف الذي يكون قد أضيف اليه ٥٠ مكل من حمض الأسيتيك ٦٠٪ .

٤-١٠-٦ الحساب

$$\text{الكرياتينين في المصل} = \frac{\text{اختبار (القراءة ١ - القراءة ٢)}}{\text{معيار (القراءة ١ - القراءة ٢)}} \times \text{٥٠٠ مكمول/ل}$$

حيث ٥٠٠ = تركيز المعيار (مكمول/ل)

٤-١٠-٧ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ٤٪

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا يتعدى ٨٪

يجب إدراج نموذجين شاهدين على الأقل بقيم معروفة تقع في المجال ٨٠-٥٠٠ مكمول/ل مع كل دفعة من النماذج . وعندما تُحلَّل نماذج مفردة يجب دائماً ضم شاهد .

ملاحظة : إذا كانت النتيجة أعلى من ٥٠٠ مكمول/ل ، خفّف ١٠٠ مكل من العينة مع ٢٠٠ مكل من الملحي (٩ غ/ل) ، وأعِدْ التحليل مستعملاً ٢٠٠ مكل من العينة المخفّفة . اضرب التركيز المقيس في ٣ للحصول على تركيز الكرياتينين في العيّنة .

٤-١٠-٨ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية للبالغين « الأصحاء » السائرين :

ذكور ٦٠ - ١٣٠ مكمول/ل
انـاث ٤٠ - ١١٠ مكمول/ل

وللتحويل من النظام الدولي الى الوحدات « القديمة » :

= مكمول/ل × ٠,٠١١٣ = مغ/١٠٠ مل

٤-١٠-٩ المراجع

Slot, C. (1965) **Scand J. Clin. Lab. Invest., 17,** 381-387.
Seaton, B. & Ali, A. (1984) **Med. Lab. Sci., 41,** 327-336.

٤-١١ قياس غلوكوز البلازما

نصف في هذا الكتيب طريقتين لقياس الغلوكوز : بالطولويدين o-Toluidine ، وأكسيداز الغلوكوز . وكاشف الطولويدين مزعج في الاستعمال بسبب التركيز العالي لحمض الأسيتيك ، ولكن ثبت أن الطريقة مفيدة فآثرنا إيرادها في الكتيب .

وقد أوردنا في ٤-١١ (ب) وصفاً تفصيلياً لاستعمال أكسيداز الغلوكوز وكان غرضنا الحث على استخدام هذه الطريقة . فهي بسيطة في تنفيذها ومعرَّضة لتداخلات قليلة لأنها تضم خطوة ترسيب البروتين protein precipitation step واكسيداز الغلوكوز موفور الآن في بلدان كثيرة وقد تكون تكلفته مماثلة إن لم تكن أقل من تكلفة استعمال الطولويدين . ولهذا فأكسيداز الغلوكوز هو الإجراء المفضل .

٤-١١(أ) قياس غلوكوز البلازما . بطريقة : الطولويدين

قم بتوسيم عدد من أنابيب الاختبار يكفي للدفعة بما فيها كفيء الكاشف (ك) ، والمعايير (م) ، والشواهد (ش١ ، ش٢) وعينات المرضى (١ ، ٢ ، ٣ ، الخ) .

ضع بالممص في الأنابيب ما يأتي :

	ك	م	ش١ ، ش٢	١،٢،٣، الخ
ماءً مقطراً (مكل)	٥٠	–	–	–
المعيار ، ١٠ ممول/ل (مكل)	–	٥٠	–	–
الشواهد (مكل)	–	–	٥٠	–
بلازما المرضى (مكل)	–	–	–	٥٠
كاشف الطولويدين (مل)	٣,٠	٣,٠	٣,٠	٣,٠

امزج الأنابيب جيداً وغطّها واحضنها في درجة حرارة ١٠٠°س لمدة ١٢ دقيقة .

برِّد الأنابيب بسرعة إلى درجة حرارة الغرفة وقِس التَماصّ .

مقياس اللون : مرشحة برتقالية ، إيلفورد ٦٠٧ (٦٠٠ نم)
مقياس طيفي : ٦٣٠ نم .
استعمل كُفيتاً جافاً أو اشطفه بحمض الاسيتيك الجَمُود واستنضِبْه ، اضبط صفر الجهاز على كفيء الكاشف (ك)

احسب النتائج بالممول/ل
تحقق من نتائج الشواهد

ملاحظة : حضِّر رشاحة filtrate خالية من البروتين إذا كانت العينة شديدة الانحلال أو يرقانية icteric ، راجع الطريقة بمجملها من أجل التفاصيل .

٤-١١(أ) الغلوكوز . الطريقة : الطولويدين

٤-١١(أ)-١ المبـدأ

يتكثف الغلوكوز مع الطولويدين في حمض الاسيتيك الجَمُود عندما يُسَّخن الى درجة الحرارة ١٠٠°س . ويكون الناتج هو الغلوكوزيلامين N-glucosylamine الأزرق-الأخضر ، الذي يقاس تَماصّه بموجة طولها ٦٣٠ نم (مرشحة رقم ٦٠٧) .

٤-١١(أ)-٢ الأجهزة والكيماويات

- الزجاجيات
  - حواجل حجمية (بأحجام ١٠٠ مل و ١ لتر)
  - ممصات حجمية (٥٠ مكل)
  - ممصات مدرّجة (٥ مل و ١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
  - مخابير قياس (١٠٠ مل و ١ لتر)
  - قوارير للكواشف عنبرية اللون (١ لتر)
  - كرات زجاجية
  - حمام للتسخين ، ١٠٠°س
  - بصلة مطاطية
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٦٣٠ نم
- مقياس اللون ، مرشحة برتقالية ، إيلفورد رقم ٦٠٧ (٦٠٠ نم)
- الكيماويات
  - د-غلوكوز ، لا مائي ، درجة الكاشف التحليلية
  - حمض الأسيتيك الجَمُود درجة الكاشف التحليلية . **تحذير** : أكّال قوي
  - حمض البنزويك
  - طولويدين
  - تيوكرباميد = تيويوريا thiourea
  - حمض ثلاثي كلور الأسيتيك . **تحذير** . أكّال قوي

تحذير : كاشف الطولويدين أكّال قوي ويجب عدم مصّه بالفم . ومن الضروري استعمال ممصات السلامة . ويوصى بصفة خاصة باستعمال موزِّع لهذا الكاشف ، إن تيسّر .

٤-١١(أ)-٣ الكواشف

١ - **محلول حمض البنزويك ، ١ غ/ل** . ذوّب ١,٠ غ من حمض البنزويك في ماء وأكمل إلى ١ لتر بالماء . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢ - **محلول الغلوكوز الخزين ١٠٠ ممول/ل** . جفّف الغلوكوز قبل وزنه في درجة حرارة ٦٠-٨٠°س لمدة ٤ ساعات . دعه يبرد في وعاء مغطّى . ذوّب ١٨ غ من الغلوكوز في ١ لتر من محلول حمض البنزويك ١ غ/ل ويمكن تقسيم هذا المحلول إلى أقسام بحجم ١٠٠ مل

توضع في قوارير بلاستيكية مسدودة بإحكام وتخزن بالتجميد الشديد . وتحت هذه الظروف يكون المحلول ثابتاً لمدة سنة على الأقل .

٣ – **معايير الغلوكوز الشغالة ، ٢,٥ ؛ ٥ ؛ ١٠ ؛ ٢٠ ؛ و٢٥ ممول/ل** . اترك محلول الغلوكوز المخزون يدفأ إلى أن يصبح في درجة حرارة الغرفة ، ثم حضِّر المعايير الشغالة بنقل كل من ٢,٥ ؛ ٥,٠ ؛ ١٠ ؛ ٢٠ و ٢٥ مل من المحلول المخزون كمّياً إلى كل من ٥ حواجل حجمية بسعة ١٠٠ مل . أكمل الحجم بمحلول حمض البنزويك ١ غ/ل . وامزج جيداً . هذه المعايير ثابتة لمدة شهر في درجة حرارة ٢–٨°س .

٤ – **كاشف الطولويدين** . ذوّب ١,٥ غ من التيوكرباميد (التيويوريا) في ٩٤٠ من حمض الأسيتيك الجَمُود . وعندما تذوب بتمامها ، أضِفْ ٦ غ من الطولويدين . امزج جيداً واخزن في قارورة عنبرية اللون . هذا الكاشف ثابت لمدة تصل إلى ٣ أشهر في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

ملاحظة : يجب أن يستعمل الكاشف بعد تحضيره مباشرة . دعه يرقد ٢٤ ساعة قبل الاستعمال .

٤–١١(أ)–٤ طريقة العمل

١ – ضع بالممص ٥٠ مكل من العينة أو المعيار (١٠ ممول/ل) في أنابيب اختبار واستعمل الكرات الزجاجية لتغطية الأنابيب (استعمل ٥٠ مكل من الماء ككفيء) .

٢ – أضف ٣,٠ مل من كاشف الطولويدين إلى كل أنبوب وامزج جيداً .

٣ – غطِّ جميع الأنابيب بالكرات الزجاجية واحضن في حمام مائي في درجة الحرارة ١٠٠°س لمدة ١٢ دقيقة بالضبط .

٤ – أخرِجْ الأنابيب من حمام التسخين وضعها في ماء بارد لمدة ٥ دقائق .

٥ – اقرأ التَمَاصّ بموجة طولها ٦٣٠ نم ، بعد ضبط صفر المقياس الطيفي على كفيء الكاشف . يبقى اللون ثابتاً قرابة ساعة .

ملاحظة : عند قراءة التَمَاصّ ، يجب أن تقلب الكُفَيْئات ، تُستَنْضَبَ تماماً بين العينات . لا تشطف بالماء بين قراءة وأخرى .

٤–١١(أ)–٥ التعيير

قبل إدخال طريقة العمل ، يلزم تحضير مخطط التعيير باستعمال معايير الغلوكوز الشغالة المعالجة بنفس الطريقة الموصوفة في « طريقة العمل » . ويجب أن يكون المخطط خطياً حتى ٢٥ ممول/ل ، وأن يمر خلال الأصل (نقطة تقاطع الإحداثيين) . حضِّر مخططاً جديداً عند كل تجديد لكاشف الطولويدين للتثبت من وجود الخطّية .

٤-١١(أ)-٦ الحساب

احسب تركيز الغلوكوز في عينات المرضى من تَمَاصّ معيار الغلوكوز (١٠ ممول/ل) .

$$\text{تركيز الغلوكوز (ممول/ل)} = \frac{\text{ص ع}}{\text{ص م}} \times \text{ت}$$

حيث ص ع = قراءة تماص عينة المريض

ص م = قراءة تماص المعيار الشغال (١٠ ممول/ل)

ت = تركيز المعيار الشغال (١٠ ممول/ل)

وإذا كانت النتيجة أعلى من ٢٥ ممول/ل ، امزج ٥٠ مكل من العينة مع ١٠٠ مكل من الملْحي (٩ غ/ل) . وأعِدْ التحليل مستعملاً ٥٠ مكل من العينة المخفّفة ، وتذكَّرْ أن تضرب النتيجة في ٣ للحصول على تركيز الغلوكوز في عينة المريض .

٤-١١(أ)-٧ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ٣٪

تباين الشروط الروتينية : يجب ألا تتعدّى هذه القيمة ٦٪ .

في كل دفعة من العينات يجب إدراج نموذجين لمصلين شاهدين على الأقل ، لهم قيم معروفة تقع في المجال ٢,٥-٢٥ ممول/ل ، ويكون أحدهما غير معلوم للفاحص . وعند تحليل نماذج مفردة ، يجب دائماً ضمّ نموذج شاهد .

٤-١١(أ)-٨ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية (غلوكوز البلازما العشوائي) للبالغين « الأصحاء » السائرين :
= ٣,٥-٧,٤ ممول/ل

قيم مرجعية تقريبية (غلوكوز البلازما على الريق) للبالغين « الأصحاء » السائرين :
= ٣,٦-٦,٤ ممول/ل

٤-١١(أ)-٩ المرجع

Cooper, G.R. & McDaniel, V. (1970) **Std. Methods Clin. Chem., 6,** 159-170.

٤-١١(أ)-١٠

ملاحظة : اذا كانت العينة شديدة انحلال الدم أو يرقانية ، فانه يلزم الحصول على رشاحة خالية من البروتين لتفادي الأخطاء الناجمة عن الهيموغلوبين أو البليروبين . وهذا الإجراء موصوف فيما يلي :

الكاشف المرسِّب للبروتين protein precipitating reagent: زن بسرعة ٣,٠ غ من حمض ثلاثي كلور الأسيتيك وذوّبها وأكمل إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر في مخبار . انقل المحلول إلى قارورة كاشف . هذا المحلول ثابت لعدة أشهر في درجة حرارة ٢-٨°س . ويجب أن لا يُمَصّ هذا الكاشف إلا باستعمال بصلة مطاطية .

طريقة العمل

١ - أضف ٠,٢ مل من عيّنة المريض أو الشاهد إلى ١,٨ مل من الكاشف المرسِّب للبروتين . امزج واترك المزيج في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق . ثم نَبِّذْ لتحصل على الطافي الرائق .

٢ - في أنبوب آخر ، أضِفْ ٠,٢ مل ماء مقطراً إلى ١,٨ مل من الكاشف المرسِّب للبروتين وامزج . يستعمل هذا المزيج في تحضير كفيء الكاشف .

٣ - في أنبوب آخر ، أضِفْ ٠,٢ مل من معيار الغلوكوز الشغّال (١٠ ممول/ل) إلى ١,٨ مل من الكاشف المرسِّب للبروتين وامزج . يستعمل هذا المزيج في تحضير المعيار .

٤ - قِسْ ٠,٥ مل من الطافي الرائق من الخطوة ١ ، و ٠,٥ مل من المحلول من الخطوة ٢ ، و ٠,٥ مل من المعيار المخفّف من الخطوة ٣ ، وضعها في ٣ أنابيب (اختبار وكفيء ومعيار) .

٥ - أضِفْ إلى كل أنبوب ٣,٥ مل من كاشف الطولويدين .

٦ - غَطِّ جميع الأنابيب بالكرات الزجاجية واحضن في حمام مائي في درجة الحرارة ١٠٠°س لمدة ١٢ دقيقة بالضبط .

٧ - ثم ضع الأنابيب في ماء بارد لمدة ٥ دقائق لكي تبرد إلى درجة حرارة الغرفة .

٨ - قِسْ التَمَاصّ بموجة طولها ٦٣٠ نم (مرشحة إيلفورد رقم ٦٠٧) بعد ضبط صفر الجهاز على كفيء الكاشف . يبقى اللون ثابتاً حوالي ساعة .

ملاحظة : عند قراءة التَمَاصّ ، يجب استنضاب الكُفَيْتات تماماً بين العينات . ولا تشطف بالماء بين القراءات .

الحســاب

احسب تركيز الغلوكوز في الشواهد وعينات المرضى كما سبق وصفه في الفقرة ٤-١١(أ)-٦ .

٤-١١(ب) قياس غلوكوز البلازما . بطريقة : أكسيداز الغلوكوز

قم بتوسيم عدد من أنابيب منبذة يكفي للدفعة بما فيها المعيار (م) والشواهد (ش١ ، ش٢) وعينات المرضى (١ ، ٢ ، ٣ ، الخ)

ضع بالممص في الأنابيب ما يلي :

	م	ش١ ، ش٢	١،٢،٣، الخ
المعيار ، ١٠ ممول/ل (مكل)	١٠٠	–	–
الشواهد (مكل)	–	١٠٠	–
بلازما المريض (مكل)	–	–	–
كاشف التنغستات–فينول (مل)	٣,٠	٣,٠	٣,٠

امزج جيداً ثم نبِّذ

قم بتوسيم مجموعة أخرى من الأنابيب تشمل كفيء الكاشف (ك) ، والمعيار (م) والشواهد (ش١ ، ش٢) وعينات المرضى (١،٢،٣، الخ)

ضع بالممص في الأنابيب ما يلي :

	ك	م	ش١،ش٢	١،٢،٣، الخ
كاشف التنغستات–فينول (مل)	١,٠	–	–	–
طافي الأنابيب أعلاه (مل)	–	١,٠	١,٠	١,٠
كاشف اللون (مل)	٣,٠	٣,٠	٣,٠	٣,٠

امزج جيداً واحضن في درجة حرارة ٣٧°س لمدة ١٥ دقيقة . رُجّ لضمان التهوية aeration .

أخرِجْ الأنابيب من الحمام المائي . وبرِّدْها إلى درجة حرارة الغرفة ، وقِسْ التماص .

مقياس اللون : مرشحة خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٤ (٥٢٠ نم)
المقياس الطيفي : ٥١٥ نم
اضبط صفر الجهاز على كفيء الكاشف (ك) .

احسب النتائج بالممول/ل
تحقق من نتائج الشواهد .

٤-١١(ب) الغلوكوز ، الطريقة : أكسيداز الغلوكوز

٤-١١(ب)-١ المبدأ

يتحول الغلوكوز بوجود أكسيداز الغلوكوز إلى حمض الغلوكونيك . ويتحول بيروكسيد الهيدروجين المُطلق بالبيروكسيداز إلى ماء وأكسجين جزيئي . وفي وجود متقبّل للأكسجين oxygen acceptor هو ٤-أمينوفينازون 4-aminophenazone ، مع الفينول ، يتكون لون قرنفلي يقاس بموجة طولها ٥١٥ نم .

٤-١١(ب)-٢ الأجهزة والكيماويات

- الزجاجيات
  - أنابيب المنبذة (١٥ مل)
  - أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
  - حواجل حجمية (١٠٠ مل و ١ لتر)
  - ممصات حجمية (١٠٠ مكل)
  - ممصات مدرّجة (١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - مخابير (١٠٠ مل و ١ لتر)
  - قوارير للكواشف ، زجاجية أو بلاستيكية (١٠٠ مل و ١ لتر)
- حمام مائي ، ٣٧°س
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٥١٥ نم
- مقياس اللون ، مرشحة خضراء ، إيلفورد ٦٠٤ (٥٢٠ نم)
- الكيماويات
  - فسفات أحادية الصوديوم ، لا مائية ، درجة تحليلية ؛
  - تنغستات الصوديوم ، ثنائية الهيدرات ؛
  - كلوريد الصوديوم ؛
  - حمض الهدروكلوريك ، المركّز . **تحذير** : أكّال قوي ؛
  - فينول ، درجة تحليله ، **تحذير** : أكّال قوي ؛
  - حمض البنزويك ؛
  - أكسيداز الغلوكوز ، راجع قسم الكواشف لتفاصيل عن بعض المصادر الملائمة لأكسيداز الغلوكوز .
  - بيروكسيداز RZ 0.3 ، أو أعلى ؛
  - ٤-أمينو فينازون ؛

- آزيد الصوديوم ؛ **تحذير** : يجب تداوله بحذر
- د-غلوكوز ، لا مائي ، لدرجة كاشف تحليلية .

٤-١١(ب)-٣ الكواشف

١ - **محلول حمض البنزويك ١ غ/ل** . ذوّب ١,٠ غ من حمض البنزويك في ماء وأكمل إلى اللتر بالماء . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢ - **محلول الغلوكوز الخزين ، ١٠٠ ممول/ل** . جفّف الغلوكوز قبل الوزن في درجة حرارة ٦٠-٨٠°س لمدة ٤ ساعات . دعه يبرد في وعاء مغلق . ذوّب ١٨,٠ غ من الغلوكوز في لتر واحد من محلول حمض البنزويك (١ غ/لتر) . يمكن تقسيم هذا المحلول إلى أقسام بحجم ١٠٠ مل وخزنها بالتجميد الشديد في قوارير بلاستيكية ذات سدادات محكمة . هذا المحلول ثابت في هذه الشروط لمدة سنة على الأقل .

٣ - **معايير الغلوكوز الشغّالة ، ٢,٥ ؛ ٥,٠ ؛ ١٠,٠ ؛ ٢٠ و ٢٥ ممول/ل** . دع محلول الغلوكوز الخزين يصل إلى درجة حرارة الغرفة . ثم حضّر المعايير الشغّالة بالنقل الكمي للمقادير ٢,٥ ؛ ٥,٠ ؛ ١٠,٠ ؛ ٢٠,٠ و ٢٥ مل من المحلول الخزين إلى كل من ٥ حواجل حجمية بسعة ١٠٠ مل . خفّفها إلى ١٠٠ مل بمحلول حمض البنزويك (١ غ/ل) ، وامزجها جيداً . وهذه المعايير ثابتة لمدة شهر في درجة حرارة ٢-٨°س .

٤ - **محلول حمض الهدروكلوريك (١ مول/ل)** . خفّف في مخبار ، ٩٠ مل من حمض الهدروكلوريك (المركز) إلى لتر واحد بالماء المقطر .

٥ - **كاشف التنغستات-فينول** . ذوّب ١٠ غ من تنغستات الصوديوم ثنائية الهيدرات و١٠ غ من الفسفات ثنائية الصوديوم اللامائية و٩ غرام من كلوريد الصوديوم في حوالي ٨٠٠ مل من الماء في حوجلة حجمية بسعة ١ لتر . انقل حوالي ١٢٥ مل من حمض الهدروكلوريك (١ مول/ل) لكي تصير الباهاء ٣,٠ (باستعمال ورق مشعر ضيق المجال narrow-range) . أضِف ١,٠ غ من الفينول ، وخفّف إلى اللتر بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٦ - **أكسيداز الغلوكوز** . يستعمل صانعون مختلفون تعريفات مختلفة لوحدات نشاط أكسيداز الغلوكوز . وقد وجد أن المنتجات الآتية مقبولة :

(أ) الفيرمكوزيم[1] ٦٥٣ أ.م. Fermcozyme 653 AM ، يلزم ٨ مل من أجل ٥٠٠ مل من الكاشف اللوني .

---

(١) Fermcozyme 653 AM and 952 DM are available worldwide from Hughes and Hughes Ltd, Romford, Essex, RM3 OHR, UK.

(ب) الفيرمكوزيم[١] ٩٥٢ د.م. Fermcozyme 952 DM يحتوي هذا المنتج على أكسيداز الغلوكوز والبيروكسيداز . ويلزم ٥ مل لكل ٥٠٠ مل من الكاشف اللوني . ولا يلزم إضافة ٨ مغ من البيروكسيداز (محلول ب) اذا استعمل الفيرمكوزيم ٩٥٢ د.م.

(ج) اكسيداز الغلوكوز ب د هـ[٢] BDH glucose oxidase (٧٥٠ وحدة سكوت/مل) ، يلزم ٢ مل من أجل ٥٠٠ مل من الكاشف اللوني .

(د) أكاسيد الغلوكوز سيغما[٣] sigma glucose oxidase type V ، يلزم ٢ مل من أجل ٥٠٠ مل من الكاشف اللوني .

(هـ) أكسيداز الغلوكوز سيغما[٣] ، نمط أكس type X ، يلزم ٢٥٠٠ وحدة (حوالي ٢٥ مغ) مذابة في ١٠ مل من الماء المقطر من أجل ٥٠٠ مل من الكاشف اللوني .

٧ - الكاشف اللوني

(أ) ذوّب ٥ غ من الفسفات ثنائية الصوديوم اللامائية في حوالي ٤٠٠ مل من الماء المقطر في حوجلة حجمية سعة ٥٠٠ مل . أضف محلول أكسيداز الغلوكوز الموصوف آنفاً في ٦ .

(ب) ذوّب ٨ مغ من البيروكسيداز (RZ 0.3) و ١٧٠ مغ من الأمينو فينازون في حوالي ١٠ مل من الماء المقطّر . امزج هذا المحلول مع المحلول (أ) أعلاه ، وأضِفْ ٥٠٠ مغ من آزيد الصوديوم كحافظ preservative وأكمل إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لمدة شهر في درجة حرارة ٢-٨°س .

٤-١١(ب)-٤ طريقة العمل

١ - ضع بالممص ١٠٠ مكل من العيّنة أو معيار الغلوكوز (١٠ ممول/ل) في أنابيب منبذة تحتوي على ٣,٠ مل من كاشف التنغستات الفينولي . امزج جيداً ونبّذ .

٢ - ضع بالممص ١,٠ مل من الطافي في أنبوب اختبار الكاشف اللوني .

٣ - للكفيء ، ضع بالممص ١,٠ من كاشف التنغستات الفينولي في انبوب اختبار آخر .

٤ - أضِفْ إلى كل أنبوب ٣,٠ من الكاشف اللوني . امزجها واتركها ١٥ دقيقة في درجة الحرارة ٣٧°س . رجّ الأنابيب مرتين أو ثلاث مرات أثناء هذه الفترة لضمان تهوية كافية .

٥ - أخرِجْ الأنابيب من الحمام المائي ودَعْها تبرد إلى درجة حرارة الغرفة .

---

(١) Fermcozyme 653 AM and 952 DM are available worldwide from Hughes and Hughes Ltd, Romford Essex, RM3 OHR, UK.

(٢) BDH Diagnostics, Broom Road, Poole, BH12 4NN, UK, or local suppliers of BDH chemicals.

(٣) Sigma Chemical Co, PO Box 14508, St. Louis, MO63178, USA, or Sigma Chemical Co Ltd, Fancy Road, Poole, Dorset, BH17 7NH, UK.

٦ – انقل مزيج التفاعل اللوني إلى كُفَيْتات cuvettes واقرأ التَمَاصّ دون تأخير بموجة طولها ٥١٥ نم (مرشحة إيلفورد ٦٠٤) ، بعد ضبط صفر المقياس الطيفي على كفيء الكاشف .

ملاحظة : ١ – للعينات المحتوية على غلوكوز مرتفع (أكثر من ٢٥ مول/ل) خفّف الطافي في كاشف التنغستات الفينولي ، مثلاً ضع بالممص ٠,٥ مل من الطافي عند الخطوة ٢ أعلاه في أنبوب وأضف ٠,٥ مل من التنغستات الفينولي ثم تابع إلى الخطوة ٤ . تذكَّرْ أن تضرب النتيجة في ٢ للحصول على تركيز الغلوكوز في العينة .

٤–١١(ب)–٥ التعـيير

حلّل معايير الغلوكوز الشغّالة مع كفيء الكاشف بنفس الطريقة الموصوفة في « طريقة العمل » . ضع قيم التَمَاصّ للمعايير مقابل تركيز المعايير في مخطط . حضِّر مخططاً جديداً عند كل تجديد للكواشف .

٤–١١(ب)–٦ الحســاب

احسب تركيز الغلوكوز في نماذج المرضى من تَمَاصّ المعيار ١٠ ممول/ل كما يلي :

$$\text{تركيز الغلوكوز ، ممول/ل} = \frac{\text{ص خ}}{\text{ص م}} \times \text{ز}$$

حيث : ص خ = قراءة التماص لاختبار المريض

ص م = قراءة التماص للمعيار الشغّال (١٠ ممول/ل)

ز = تركيز المعيار الشغال (١٠ ممول/ل)

٤–١١(ب)–٧ ضـمان الجـودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ٣٪

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدى هذه القيمة ٦٪ .

في كل دفعة من النماذج يجب ادراج نموذجين لمصلين شاهدين على الأقل ، لهما قيم معروفة تقع في المجال ٢,٥–٢٥ ممول/ل . وأحدهما غير معلوم للفاحص . وعند تحليل نماذج مفردة ، يجب دائماً ضم نموذج شاهد .

٤–١١(ب)–٨ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية (غلوكوز المصورة العشوائي) للبالغين « الأصحاء » السائرين :

= ٣,٠ – ٧,٤ ممول/ل

قيم مرجعية تقريبية (غلوكوز المصورة على الريق) للبالغين « الأصحاء » :

= ٣,٥ – ٦,٤ ممول/ل

وللتحويل من وحدات النظام الدولي إلى الوحدات « القديمة » :

ممول/ل × ١٨ = مغ/١٠٠ مل

٤-١١(ب)-٩ المرجع

Trinder, P. (1969) **Annals of Clin. Biochem., 6**, 24-27

٤-١٢ الصوديوم والبوتاسيوم . الطريقة : القياس الطيفي للإصدار اللهبي

لا يوصى باستعمال طرائق قياس اللون في تقدير الصوديوم والبوتاسيوم في السوائل الحيوية . ويجب إجراء تعيين هذه الأيونات باستعمال مقياس طيفي للإصدار اللهبي flame emission spectrometer كان يسمى سابقاً « المقياس الضوئي اللهبي flame photometer » ، أو باستعمال مساري كهربائية انتقائية للشوارد ion selective electrodes .

ويوجد عدد كبير من الأجهزة المناسبة متيسّرة تجارياً ، ولكنها تتباين كثيراً من حيث التعقيد . ولهذا فليس من الملائم في هذا الكتيب ، ايراد وصف تفصيلي للإجراءات التحليلية لتقدير الصوديوم والبوتاسيوم ، لأنها سوف تتباين حسب الجهاز المستخدم .

ويوصى بأن تتوافر في أي جهاز يقع عليه الاختيار لهذا الغرض الخصائص التالية :

(أ) تقدير متزامن simultaneous للصوديوم والبوتاسيوم ، إذا أمكن ذلك ؛

(ب) عرض رقمي للنتائج بوحدات التركيز (ممول/ل) ؛

(ج) معيار داخلي لليتيوم أو السيزيوم ، للقياس الطيفي للإصدار اللهبي .

ويفضل – ولو أنه لا يتحتم – عمل تخفيف على التسلسل in-line لعينات الأمصال حين القياس الطيفي للإصدار اللهبي . ويجب استعمال معيار مائي مشترك يخفف بنفس الطريقة المتبعة في المصل تماماً . ويجب استعمال غاز البوتان أو البروبان (« غاز الطبخ ») ، وماء منزوع الشوارد أو مكرر التقطير .

ولا يوصى باستعمال مساري كهربائية انتقائية للشوارد في الوقت الحاضر بسبب ارتفاع تكاليف استبدال المساري الكهربائية electrodes ، مما يؤدي الى ارتفاع تكلفة الاختبار في المختبرات التي يستهدفها هذا الكتيب . وتوجد معلومات أكثر عن اقتصاديات المساري الكهربائية الانتقائية للشوارد في المرجع [8] .

ولا لزوم لعامل التحويل من وحدات النظام الدولي إلى وحدات « قديمة » حيث أن ١ ممول/ل = ١ ميلي مكافىء/ل 1 mmol = 1 mEq/1 .

٤-١٢-١ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ١,٠٪ للصوديوم و١,٥٪ للبوتاسيوم

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدى هذه القيمة ٢٪ للصوديوم و٣٪ للبوتاسيوم .

في كل دفعة من النماذج يجب إدراج نموذجين لمصلين شاهدين على الأقل لهما قيم معروفة تقع في المجال ٣,٠-٦,٠ ممول/ل للبوتاسيوم و ١٢٠-١٥٠ ممول/ل للصوديوم ، وأحدهما غير معلوم للفاحص . وعند تحليل نماذج مفردة ، يجب دائماً ضم نموذج شاهد .

٤-١٢-٢ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية للبالغين « الأصحاء » السائرين :

الصوديوم : ١٣٥-١٤٦ ممول/ل والبوتاسيوم : ٣,٥-٥,٢ ممول/ل

ملاحظة : من الضروري استعمال زراقات وأنابيب للنماذج نظيفة وجافة لتلافي انحلال الدم الذي يسبب تحرير البوتاسيوم من كريات الدم الحمراء . ولا يجوز استعمال مضادات للتخثر تحتوي على أملاح الصوديوم أو البوتاسيوم . ويمكن استعمال البلازما من عينات جمعت في مضاد التخثر ليتيوم-هيبارين ، أو استعمال المصل لقياس الصوديوم والبوتاسيوم .

٤-١٣ قياس اجمالي بروتين المصل أو البلازما . بطريقة : البيوريت Biuret

قم بتوسيم عدد من الأنابيب يكفي للدفعة بما فيها كفيء الكاشف (ك ك) ، والمعيار (م) ، والشواهد (ش١ ، ش٢) وعينات المرضى (١،٢،٣، الخ) . وهذه الأنابيب هي لكفيء الكاشف و « الاختبارات » .

قم بتوسيم أنبوب كفيء مقابل كل أنبوب « اختبار » ، أي ك م ، ك ش١ ، ك ش٢ ، ك١ ، ك٢ ، ك٣ ، الخ . وهذه هي « الكوافىء » .

ضع بالممص في الأنابيب ما يلي :

	ك ك	م	ش١،١،٢، الخ	ك م	ك ش١، ك١،ك٢ الخ
كاشف البيوريت (مل)	٢,٥	٢,٥	٢,٥	–	–
كفيء كاشف البيوريت (مل)	–	–	–	٢,٥	٢,٥
ماء مقطر (مكل)	٥٠	–	–	–	–
معيار بروتين ١٠٠ غ/ل (مكل)	–	٥٠	–	٥٠	–
عيّنات الشواهد أو المرضى (مكل)	–	–	٥٠	–	٥٠

امزجها جيداً واتركها في درجة الحرارة ٣٧°س لمدة ١٠ دقائق أو في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة

مقياس اللون : مرشحة صفراء–خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٥ (٥٥٠ نم)
مقياس طيفي : ٥٤٠ نم
اضبط صفر الجهاز على كفيء كاشف البيوريت
قِسْ أولاً تَماصّ ك م ، ك ش١ ، ك١ ، ك٢ ، الخ ثم تَماصّ ك ك ، ثم قِسْ تَماصّ م ، ش١ ، ١ ، ٢ ، الخ .

احسب النتائج بالغرام/باللتر (غ/ل)
تحقق من نتائج الشواهد .

٤-١٣ اجمالي البروتين . الطريقة : البيوريت

٤-١٣-١ المبــدأ

تكوِّن بروتينات المصل مركباً بنفسجياً–أزرق مع أيونات النحاس في محلول قلوي . ويقاس تَماصّ هذا المركب بموجة طولها ٥٤٠ نم . ويحبّذ استعمال طريقة تستخدم كفيء عينة لتجنب الأخطاء الناجمة عن العكر .

٤-١٣-٢ الأجهزة والكيماويات

- الزجاجيات
  - حواجل حجمية (بأحجام ٥٠٠ مل و ١ لتر)
  - ممصات حجمية (٥٠ مكل)
  - ممصات مدرّجة (٥ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - مخابير متدرجة (١٠٠ مل و ٥٠٠ مل)
  - أنابيب اختبار (١٥٠ مم × ١٦ مم)
  - دوارق (٢٥٠ مل)
- قوارير من عديد الاتيلين للكواشف (١ لتر)
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٥٤٠ نم
- مقياس اللون ، مرشحة صفراء–خضراء ، إيلفورد ٦٠٥ (٥٥٠ نم)
- الكيماويات
  - كلوريد الصوديوم
  - آزيد الصوديوم . **تحذير** : تداوله بعناية
  - هيدروكسيد الصوديوم ، حبيبات
  - سلفات النحاس ، خماسية الهدرات
  - طرطرات البوتاسيوم والصوديوم ، رباعية الهيدرات ؛
  - يوديد البوتاسيوم
  - ألبومين ، بقري ، مسحوق الجزء ٥ fraction V powder ملائم .

٤-١٣-٣ الكواشـف

١ – **محلول هيدروكسيد الصوديوم ٦ مول/ل** . ذوّب ١٢٠ غ من هيدروكسيد الصوديوم شيئاً فشيئاً في حوالي ٤٠٠ مل من الماء المقطر . خفّف بعد أن تبرّد إلى ٥٠٠ مل . اخزن المحلول

في قارورة من البولي اتيلين مسدودة بإحكام . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٢ – **كاشف البيوريت** . ذوّب ٣,٠ غ من سلفات النحاس في حوالي ٥٠٠ مل من الماء المقطر . أضف ٩,٠ غ من طرطرات البوتاسيوم والصوديوم و ٥,٠ غ من يوديد البوتاسيوم . وعند اكتمال ذوبانه ، أضف ١٠٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٦ مول/ل) وأكمل إلى ١ لتر بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س عندما يحفظ في قارورة من البولي اتيلين مسدودة بإحكام .

٣ – **كاشف كفيء البيوريت** . ذوّب ٩,٠ غ من طرطرات البوتاسيوم والصوديوم و ٥,٠ غ من يوديد البوتاسيوم في الماء . أضف ١٠٠ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (٦ مول/ل) وخفّف إلى اللتر بالماء . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س عندما يحفظ في قارورة كاشف مسدودة بإحكام .

٤ – **محلول كلوريد الصوديوم/وآزيد الصوديوم** . زِنْ ٩,٠ غ من كلوريد الصوديوم و ١,٠ غ من آزيد الصوديوم ، وذوّبهما في ماء مقطر وأكمل إلى اللتر . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٥ – **معيار البروتين ، ١٠٠ غ/ل** . زِنْ حوالي ٥,٣ غ من مسحوق الألبومين البقري و جفّفها طوال الليل في فرن بدرجة حرارة ٦٠°س . زِنْ بعد التجفيف ٥,٠ غ بالضبط من مسحوق الألبومين البقري الجاف . عوِّمْ المسحوق على سطح محلول من حوالي ٣٠ مل من كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم في دورق صغير . وعندما يذوب الألبومين ، انقل المحلول إلى حوجلة حجمية بسعة ٥٠ مل (اسكبه ببطء على جدار الحوجلة لتجنب تشكّل رغوة) . اشطف الدورق بمقادير صغيرة من محلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم وأضفها إلى الحوجلة . أكمل المحلول إلى ٥٠ مل بمحلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم . هذا المحلول ثابت لمدة ٦ أشهر في درجة حرارة ٢–٨°س . ومعايير إجمالي البروتين متيسّرة تجارياً وقد تكون أكثر ملاءمة للمختبرات التي تجري القليل من التحليلات .

٤–١٣–٤ طريقة العمل

١ – للمعيار ولكل من عينة المريض أو الشاهد ضع بالممص في أنابيب اختبار ٢,٥ مل من كاشف البيوريت (المعيار والاختبار) ، و ٢,٥ مل من كاشف كفيء البيوريت (كفيء المعيار وكفيء العينة) .

٢ – أضف ٥٠ مكل من المعيار (١٠٠ غ/ل) أو من العينات إلى كل زوج من الأنابيب .

٣ – يُحضَّر كفيء كاشف لكل دفعة ، تحتوي على ٢,٥ مل من كاشف البيوريت و ٥٠ مكل من الماء .

٤ – امزج كل أنبوب واترك الأنابيب في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة أو في درجة حرارة ٣٧°س لمدة ١٠ دقائق (**ملاحظة** : يجب استعمال نفس درجة الحرارة للمعايير والعينات) .

٥ – قس التَمَاصّ بموجة طولها ٥٤٠ نم (مرشحة صفراء–خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٥) بعد ضبط صفر المقياس الطيفي على كاشف كفيء البيوريت . اقرأ أولاً تماص كوافيء العينات ، ثم كفيء الكاشف ، ثم الاختبارات .

٦ – اذا كانت النتائج أعلى من ١٢٠ غ/ل ، أعِدْ التحليل مستعملاً ٢٠ مكل من العينة . واضرب النتيجة في ٢,٥ للحصول على تركيز البروتين .

٤–١٣–٥ التعـيير

مع أن قياس إجمالي البروتين بسيط ، فإن نتائج البرامج الخارجية لتقييم الجودة تشير إلى أن كثيراً من المختبرات تجد صعوبة في الحصول على نتائج دقيقة . والمشكلة في الغالب ناجمة عن أخطاء التعيير أو عن استعمال مصل عكر بدون تصحيح بكفيء العينة .

وتقترح الطريقة المحبّذة استعمال محلول الألبومين البقري كمُعْتَار calibrator . وهناك بديل آخر هو استعمال معتار من مصل مجفّد lyophilised . ولكن كثيراً من هذه المعتارات تظهر عكراً ملحوظاً significant عند استنشائها ، وأحياناً يكون من الصعب أن يعرف المرء إن كان إسهام العكر في التماص عند الموجة ٥٤٠ نم قد تم طرحه عند حساب قيمة إجمالي البروتين . استعمل ما أمكنك ذلك معاد معتاراً عُيّنت قيمته بطريقة من طرق اجمالي البروتين تشتمل على كفيء للعينة . وعند استعمال محلول الألبومين البقري ، لا يلزم استعمال كفيء العينة للمعيار (ك م) .

وثمة بديل آخر ، ألا وهو استعمال قارورة ألبومين مصل بشري بعد انتهاء صلاحيتها من قسم نقل الدم أو الصيدلية . استخدم تركيز الألبومين المكتوب على القارورة لقيمة اجمالي البروتين . وتكفي قارورة واحدة لعدة أشهر في درجة حرارة ٢–٨°س إذا سحبت منها مقادير صغيرة (٥–١٠ مل) حسب الحاجة باستخدام زرّاقة معقمة .

تحضير مخطط التعيير باستعمال الألبومين البقري

حضِّر مخطط تعيير للتثبت من أن الطريقة خطِّيَّة بمقياسك الطيفي حتى ١٠٠ غ/ل على الأقل . وعندما يثبت أنها خطية ، يمكن عندئذ استعمال معيار واحد (١٠٠ غ/ل) مع كل دفعة من عينات المرضى .

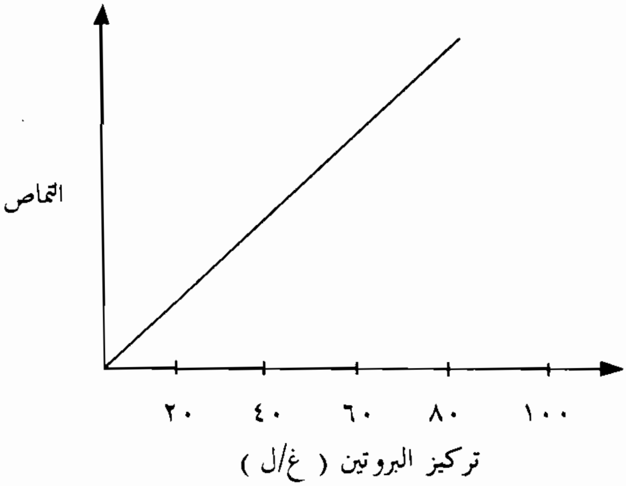
المعيار الشغّال رقم :	١	٢	٣	٤	٥
معيار البروتين ١٠٠ غ/ل (مل)	٠,٢	٠,٤	٠,٦	٠,٨	١,٠
محلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم (مل)	٠,٨	٠,٦	٠,٤	٠,٢	صفر
تركيز محلول المعيار الشغّال (غ/ل)	٢٠	٤٠	٦٠	٨٠	١٠٠

قم بتوسيم ستة أنابيب كما يلي : كفيء الكاشف (ك ك) ، معايير شغّالة : رقم ١ (م١ = ٢٠ غ/ل) ، رقم ٢ (م٢ = ٤٠ غ/ل) ، رقم ٣ (م٣ = ٦٠ غ/ل) ، رقم ٤ (م٤ = ٨٠ غ/ل) و رقم ٥ (م٥ = ١٠٠ غ/ل) .

ضع بالممص ٢,٥ مل من كاشف البيوريت في كل أنبوب ، وأضف ٥٠ مكل من الماء المقطر إلى كفيء الكاشف ، و ٥٠ مكل من محلول معيار شغال في الأنبوب المقابل له . امزج الأنابيب واتركها في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة أو في درجة الحرارة ٣٧°س لمدة ١٠ دقائق .

اقرأ التماصّ بموجة طولها ٥٤٠ نم بعد ضبط صفر الجهاز على كفيء الكاشف .

حضّر مخطط التعيير بوضع قيم التَمَاصّ على المحور العمودي مقابل تركيز البروتين في كل أنبوب على المحور الأفقي .



تحضير مخطط التعيير باستعمال معتار مصلي

اذا استعمل معتار عكر في تحضير مخطط التعيير ، فانه يجب استعمال كفيء عينة لكل نقطة على مخطط التعيير . والمعتارات المصلية يكون تركيز إجمالي البروتين فيها عادة في المجال ٦٠-٧٠ غ/ل . ويبين الجدول أدناه كيفية تحضير مخطط التعيير من معتار مصلي عكر تركيز إجمالي البروتين فيه ٧٠ غ/ل .

قم بتوسيم ٩ أنابيب	كك	١	٢	٣	٤	ك١	ك٢	ك٣	ك٤
المعتار المصلي (مكل)	–	١٠	٢٠	٥٠	٧٠	١٠	٢٠	٥٠	٧٠
كاشف البيوريت (مل)	٢,٥	٢,٥	٢,٥	٢,٥	٢,٥	–	–	–	–
كاشف كفيء البيوريت (مل)	–	–	–	–	–	٢,٥	٢,٥	٢,٥	٢,٥
ماء مقطر (مكل)	٥٠	–	–	–	–	–	–	–	–
تركيز إجمالي البروتين (غ/ل)	–	١٤	٢٨	٧٠	٩٨				

استعمل للأنبوبين ٤ ، ك٤ ، ٥٠ مكل و ٢٠ مكل لكي تحصل على ٧٠ مكل من المعتار المصلي . قِسْ التَمَاصّ بموجة طولها ٥٤٠ نم (مرشحة صفراء-خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٥) ، بعد ضبط صفر الجهاز على كاشف كفيء البيوريت . اقرأ أولاً تماص (ص) ك١ ، ك٢ ، ك٣ ، ك٤ ، ثم كك ، ثم ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ .

احسب التماص المصحح للأنابيب ١-٤ كما يلي :

التماص المصحح ، أنبوب ١ = ص١ - صك١ - صكك

حيث ص١ = تماص الأنبوب ١

صك١ = تماص أنبوب ك١

صكك = تماص أنبوب كك

بعد ضبط صفر الجهاز على كاشف كفيء بيوريت .

حضِّر مخطط التعيير بوضع التَمَاصّ المصحَّح للأنابيب ١-٤ على المحور العمودي مُقابل تركيز إجمالي البروتين على المحور الأفقي المبين في الجدول أعلاه .

ملاحظة : عندما لا يكون تركيز اجمالي البروتين (القيمة المعيَّنة) ٧٠ غ/ل ، فإنه يمكن حساب التركيز في الأنابيب ١-٤ أعلاه كما يلي :

الأنبوب ١ = $\frac{\text{القيمة المعيّنة}}{٥}$ الأنبوب ٢ = $\frac{\text{القيمة المعينة}}{٥}$ × ٢

الأنبوب ٣ = القيمة المعينة الأنبوب ٤ = $\frac{\text{القيمة المعينة}}{٥}$ × ٧

٤-١٣-٦ الحساب

تماص المعيار المصحح : م = ص المعيار − ص كفيء المعيار − ص كفيء الكاشف

تماص عينة الاختبار المصحح : خ = ص خ − ص كفيء عينة الاختبار − ص كفيء الكاشف

فيكون إذن تركيز بروتين مصل عينة الاختبار = $\frac{خ}{م}$ × ١٠٠ غ/ل

حيث ١٠٠ هي قيمة تركيز المعيار (غ/ل)

وللتحويل من النظام الدولي إلى الوحدات « القديمة » : $\frac{غ/ل}{١٠}$ = غ/١٠٠ مل

٤-١٣-٧ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب امكان تحقيق معامل اختلاف قدره حوالي ٢٪

تباين الشروط الروتينية : يجب أن لا تتعدى هذه القيمة ٤٪ .

في كل دفعة من النماذج يجب إدراج نموذجين لمصلين شاهدين على الأقل لهما قيم معروفة تقع في المجال ٤٠–٨٠ غ/ل . وأحدهما غير معلوم للفاحص . وعند تحليل نماذج مفردة ، يجب دائماً ضم نموذج شاهد .

٤-١٣-٨ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية : ٦٠–٨٠ غ/ل .

٤-١٣-٩ المرجع

Doumas, B.T. (1975) **Clin. Chem., 21,** 1159-1166.

ملاحظة : يمكن تقدير إجمالي البروتين في المصل أو البلازما (ولكن ليس في البول أو السائل النخاعي) بقياس الانكسار refractometry . وطريقة العمل بسيطة جداً ولكن يلزم وجود مقياس الانكسار refractometer . ويوجد مزيد من التفاصيل في المرجع [8] .

٤-١٤ قياس اليوريا urea في المصل/البلازما . الطريقة : ثنائي اسيتيل المونوكسيم

Diacetyl monoxime

قم بتوسيم عدد من أنابيب منبذة تكفي للدفعة وتضم المعيار (م) والشواهد (ش١ ، ش٢) وعينات المرضى (١،٢،٣، الخ)

حضِّر كمية من الكاشف اللوني (امزج حجمين متساويين من الكاشف الحمضي وكاشف ثنائي اسيتيل المونوكسيم) تكفي لعدد العينات المتوقعة خلال اليوم .

ضع بالممص في الأنابيب ما يلي :

	م	ش١ ، ش٢	١،٢،٣، الخ
المعيار ، ١٠ ممول/ل (مكل)	٥٠	–	–
الشواهد (مكل)	–	٥٠	–
عينات المرضى (مكل)	–	–	٥٠
حمض ثلاثي كلور الاسيتيك (مل)	٠,٥	٠,٥	٠,٥

امزج الأنابيب جيداً ونبذّها

قم بتوسيم مجموعة ثانية من الأنابيب تضمّ كفيء الكاشف (ك) ، والمعيار (م) والشواهد (ش١ ، ش٢) ، وعيّنات المرضى (١،٢،٣، الخ)

ضع بالممص في الأنابيب ما يلي :

	ك	م	ش١،ش٢	١،٢،٣، الخ
محلول حمض ثلاثي كلور الاسيتيك (مكل)	١٠٠	–	–	–
الطافي من الأنابيب أعلاه (مكل)	–	١٠٠	١٠٠	١٠٠
الكاشف اللوني (مل)	٣,٠	٣,٠	٣,٠	٣,٠
امزج جيداً				

ضع جميع الأنابيب في حمام ماء يغلي أو على سخّان ضبطت حرارته على الدرجة ١٠٠°س لمدة ١٥ دقيقة .

برِّد الأنابيب إلى درجة حرارة الغرفة ، وامزجها جيداً ، واقرأ التماصّ بدون تأخير .

(تكملة) ٤-١٤ قياس اليوريا urea في المصل/البلازما . الطريقة : ثنائي اسيتيل المونوكسيم
Diacetyl monoxime

مقياس اللون : مرشحة خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٤ (٥٢٠ نم) مقياس طيفي : ٥٣٠ نم اضبط صفر الجهاز على الأنبوب ك
احسب النتائج بالممول/ل تحقق من نتائج الشواهد .

٤-١٤ اليوريا . الطريقة : ثنائي اسيتيل المونوكسيم

٤-١٤-١ المبــدأ

يتم ترسيب البروتينات في الدم الكامل أو البلازما أو المصل بحمض ثلاثي كلور الاسيتيك . تتفاعل اليوريا في الطافي مع ثنائي أسيتيل المونوكسيم في وجود التيوسيمي كربازيد thiosemicarbazide وشوارد الكدميوم في بيئة حمضية . يقاس تماص المحلول الوردي-الأرجواني الناتج بموجة طولها ٥٣٠ نم .

٤-١٤-٢ الأجهزة والكيماويات

- قوارير عنبرية اللون للكواشف (بحجم ٥٠٠ مل)
- ممصات مدرّجة (٥ و ١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
- مخبار مدرّج (١٠٠ مل و ٥٠٠ مل)
- حواجل حجمية (بأحجام ٥٠ و ١٠٠ و ٥٠٠ مل)
- ممصات حجمية (٥٠ و ١٠٠ مكل)
- أنابيب اختبار
- حمام مائي ، ١٠٠°س أو سخان مضبوط الحرارة ، ١٠٠°س
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٥٣٠ نم
- مقياس اللون ، مرشحة خضراء ، إيلفورد ٦٠٤ (٥٢٠ نم)
- حمض البنزويك
- سلفات الكدميوم ($3CdSO_4, 8H_2O$) . راجع الملاحظة تحت الفقرة ٤-١٤-٩
- ثنائي أسيتيل المونوكسيم

- حمض الفسفوريك (٨٥٪ وزن/حجم) **تحذير** : أكّال ، تداوله بعناية
- حمض السلفوريك ، مركّز (٩٥–٩٧٪ وزن/حجم) **تحذير** : أكّال ، تداوله بعناية
- تيوسيمي كربازيد.
- حمض ثلاثي كلور الأسيتيك . **تحذير** : أكّال ، تداوله بعناية
- يوريا ، نقية .

٤–١٤–٣ الكواشف

١ – **الكاشف الحمضي** . ضع حوالي ٢٠٠ مل من الماء المقطّر في حوجلة حجمية سعة ٥٠٠ مل . ثم أضف ببطء ٤٤,٠ مل من حمض السلفوريك (المركز) و ٦٦ مل من حمض الفسفوريك . برِّد المحلول إلى درجة حرارة الغرفة ولكن لا تستعمل الماء المثلّج كحمام مبرِّد . أضف ٥٠ مغ تيوسيمي كربازيد وذوّبها ، ثمّ أضف ١,٦ غ من سلفات الكدميوم و ذوّبها ، وأضِفْ ١,٥ مل من محلول معيار اليوريا الشغال (٢,٥ ممول/ل) . أكمل إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطّر . انقل المحلول إلى قارورة عنبرية اللون . هذا المحلول ثابت لمدة ٦ أشهر على الأقل في درجة حرارة ٢–٨°س .

ملاحظة : وجود كمية صغيرة من اليوريا في الكاشف يحسِّن خطِّيَّة منحني التعيير . وتُحسِّن سلفات الكدميوم ثبات الناتج النهائي الملوّن . راجع الملاحظة تحت الفقرة ٤–١٤–٩ .

٢ – **كاشف ثنائي أسيتيل المونوكسيم** . زن ٢,٠ غ من ثنائي أسيتيل المونوكسيم ، وذوّبها في الماء المقطر وخفف إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر في حوجلة حجمية . هذا المحلول ثابت لمدة ٦ أشهر على الأقل في درجة حرارة ٢–٨°س .

٣ – **الكاشف اللوني** . استعمل مخباراً مدرّجاً وامزج ٥٠ مل من الكاشف الحمضي و ٥٠ مل من كاشف ثنائي أسيتيل المونوكسيم في قارورة صغيرة . هذه الكمية تكفي لإجراء ٣٣ تفاعلاً . يجب تحضير هذا الكاشف يومياً ، ولهذا يتوقف الحجم المحضّر على عدد التفاعلات المتوقّعة . يحتاج كل تفاعل إلى ٣,٠ مل .

٤ – **محلول حمض البنزويك ١ غ/ل** . زِنْ ٠,٥ غ من جمض البنزويك وضعها في قارورة سعة ٥٠٠ مل . أضف ٥٠٠ مل من الماء المقطّر من مخبار مدرّج . امزج جيداً وذوّب . هذا المحلول ثابت لعدة أشهر في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٥ – **محلول حمض ثلاثي كلور الاسيتيك ، ٥٠ غ/ل** . زِنْ ٢٥ غ من حمض ثلاثي كلور الاسيتيك وذوّبها وأكمل إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطّر . هذا المحلول ثابت لعدة أشهر في درجة حرارة ٢٠–٢٥°س .

٦ – **محلول اليوريا الخزين ، ١٢٥ ممول/ل** . زِنّ ٧٥٠ مغ من اليوريا وضعها في حوجلة حجمية سعة ١٠٠ مل . أضف ٥٠ مل من محلول حمض البنزويك ، وذوّب وخفّف إلى ١٠٠ مل بمحلول حمض البنزويك . هذا المحلول ثابت لعدة أشهر في درجة حرارة ٢–٨°س .

٧ – **معايير اليوريا الشغّالة**

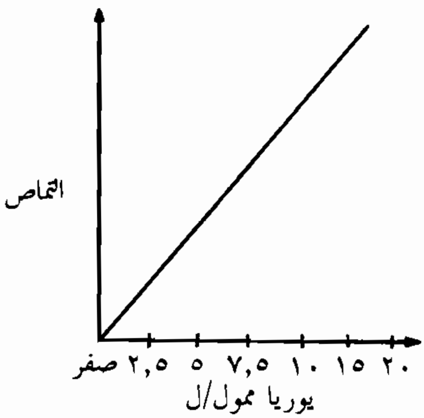
حضِّر معايير اليوريا الشغالة في حواجل حجمية سعة ٥٠٠ مل حسب الجدول الآتي :

معيار شغال رقم :	١	٢	٣	٤	٥	٦
معيار اليوريا الخزين (١٢٥ ممول/ل) (مل)	١	٢	٣	٤	٦	٨
محلول حمض البنزويك	أكمل إلى ٥٠ مل في كل أنبوب					
تركيز محلول المعيار الشغّال (ممول/ل)	٢,٥	٥,٠	٧,٥	١٠	١٥	٢٠

تكون هذه المعايير ثابتة عدّة أشهر في الدرجة ٢–٨°س .

٤–١٤–٤ تحضير مخطط التعيير

في هذه الطريقة ، يتوقف تكوين المنتوج الملوّن على تركيب الكاشف اللوني ومدة التسخين في درجة الحرارة ١٠٠°س . وقد تحدث تباينات صغيرة من يوم إلى آخر ، ولهذا يتحتم التحقق من التعيير في كل مرة تُحلَّل فيها عينات المرضى . وعندما تكون على معرفة جيدة بشكل مخطط التعيير على مقياسك الطيفي ، فقد تجد أنه يمكنك الاستغناء عن بعض المعايير ، مثلاً : حَضِّر تعييرك اليومي مستخدماً المعايير ٥ ؛ ١٠ ؛ ٢٠ ممول/ل ، أو استعمل المعيار ١٠ ممول/ل مع عملية الحساب الموصوفة في الفقرة ٤–١٤–٦ . ويجب تحضير مخطط تعيير باستعمال جميع المعايير عند تجديد الكاشف الحمضي وكاشف ثاني اسيتيل المونوكسيم ، للتحقق من أن الكواشف صحيحة .



اتّبع الإجراء الموصوف تحت « طريقة العمل » . وضع التماص لكل أنبوب على المحور العمودي مقابل تركيزات محاليل معيار اليوريا الشغّال بالممول/ل على المحور الأفقي .

٤-١٤-٥ طريقة العمل

١ - ضع بالممص ٠,٥ مل من محلول حمض ثلاثي كلور الاسيتيك ، مستخدماً بصلة مطاطية ، في أنابيب منبذة لكل معيار أو مصل شاهد أو عينة مريض . وأضف ٥٠ مكل من المعيار أو المصل الشاهد أو عينة المريض إلى الأنبوب الملائم . وامزج الأنابيب واتركها في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق . ثم نبّذها لتحصل على طافية رائقة .

٢ - ضع بالممص ٣,٠ من الكاشف اللوني في أنابيب كل من المعيار والكفيء والمصل الشاهد والعينة .

٣ - ضع بالممص مستخدماً بصلة مطاطية ١٠٠ مكل من محلول حمض ثلاثي كلورالاسيتيك في أنبوب الكفيء و ١٠٠ مكل من الطافي من كل من المعايير أو الشواهد أو العينات في الأنبوب الملائم .

٤ - امزج الأنابيب جيداً وسخّنها في درجة حرارة ١٠٠°س لمدة ١٥ دقيقة .

٥ - برِّد الأنابيب إلى درجة حرارة الغرفة في وعاء ماء (لمدة حوالي ٥ دقائق) . امزج واقرأ التَماصّ بموجة طولها ٥٣٠ نم (مرشحة خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٤) . اقرأ أولاً تماص الكفيء مقابل الماء المقطّر ، ثم اضبط صفر الجهاز على الكفيء واقرأ المعايير والاختبارات المجهولة . يجب إجراء قياسات التماصّ بأسرع ما يمكن بحيث لا تتعدى ٣٠ دقيقة بعد انتهاء الخطوة ٤ .

٤-١٤-٦ الحساب

اقرأ النتائج من منحني التعيير أو استعمل المعادلة الآتية عندما يكون مخطط التعيير خطّياً :

$$\text{تركيز اليوريا بالممول/ل} = \frac{\text{خ} \times \text{ز}}{\text{م}}$$

حيث : خ = قراءة تماص اختبار المريض

م = قراءة تماص المعيار الشغّال (١٠ ممول/ل)

ز = تركيز المعيار الشغال (١٠ ممول/ل)

وإذا كانت النتيجة أعلى من ٢٠ ممول/ل ، خفّف ٥٠ مكل من طافية تلك العينة مع ١٠٠ مكل من محلول حمض ثلاثي كلورالاسيتيك . امزج جيداً وأعِدْ التحليل مستعملاً ٣,٠ مل من الكاشف اللوني مع ١٠٠ مكل من الطافية المخففة . وتذكر أن تضرب النتيجة في ٣ للحصول على تركيز اليوريا في عينة المريض .

٤-١٤-٧ ضمان الجودة

تباين الشروط المثلى : يجب إمكان تحقيق معامل اختلاف مدته حوالي ٣٪

تباين الشروط الروتينية : يجب ألا يتعدى هذا الرقم ٦٪

في كل دفعة من النماذج يجب إدراج نموذجين مصليين شاهدين على الأقل ، لهما قيم معروفة تقع في المجال ٣-٢٠ ممول/ل ، وأحدهما غير معلوم للفاحص . وعند تحليل نماذج مفردة ، يجب دائماً ضم نموذج شاهد .

٤-١٤-٨ القيم المرجعية

قيم مرجعية تقريبية للبالغين « الأصحاء » السائرين : ٣,٣-٧,٧ ممول/ل
للتحويل من وحدات النظام الدولي إلى الوحدات « القديمة » : ممول/ل × ٦ = مغ/١٠٠ مل .

٤-١٤-٩ المراجع

Wybenga, D.R., Di Giorgio, J. & Pileggi, V.J. (1971) **Clin. Chem., 17,** 891-895.
Seaton, B. & Ali, A. (1984) **Med. Lab. Sciences, 41.** 327-336.

ملاحظة : تستعمل الطريقة المحبّذة الكواشف الموصوفة في المراجع المذكورة آنفاً . ولكن ضُمّ مرسّب للبروتين لأن الطريقة المباشرة (بدون ترسيب البروتين) أعطت نتائج على عينات مرضى كانت أعلى كثيراً من نتائج طرائق أخرى .

ولقد ضُمّت سلفات الكدميوم كما أوصى ويبنغا وزملاؤه . ففي غياب شوارد الكدميوم انخفض التماص حوالي ٧٪ في ٣٠ دقيقة ، وعندما كان يحضر كاشف اللون كما هو موصوف انخفض التماص حوالي ٤٪ في ٣٠ دقيقة . وعندما يحتفظ بحجم الدفعة صغيراً بحيث يمكن إجراء قراءات التماص في بحر دقائق قليلة ، فان وجود أو غياب شوارد الكدميوم يكون أثره ضعيفاً على النتائج إن وجد .

٥ – اختبارات السائل النخاعي

٥–١ جمع نماذج السائل النخاعي

يوجد السائل النخاعي spinal fluid في الجوف المحيط بالدماغ brain في الجمجمة ، وبالنخاع الشوكي في العمود الفقاري spinal column . وهو يغذي النُسُج في الجهاز العصبي المركزي ويساعد في حماية الدماغ والنخاع من الإصابة . وحجم السائل النخاعي في البالغين ١٠٠–١٥٠ مل .

– لا يقوم بأخذ العينة سوى طبيب أو ممرضة مدربة تدريباً خاصاً . ويجب أن يكون العاملون في المختبر حاضرين ، لتوصيل النموذج إلى المختبر فوراً بعد أخذه .

– يؤخذ السائل النخاعي في أنبوبين معقمين برقمان ١ ، ٢ :

الأنبوب ١ – قطرات قليلة

الأنبوب ٢ – ٦–٧ مل

– يطرح الأنبوب ١ إذا تبين أنه يحتوي على كريات حمراء

يستعمل الأنبوب ٢ للفحص الفيزيائي والكيميائي والمجهري .

ولا يصلح السائل النخاعي لقياس الغلوكوز واجمالي البروتين إذا كانت فيه ثفالة sediment واضحة من الكريات الحمراء .

٥–٢ ضمان الجودة

١ – لا تؤجّل اختبار السائل النخاعي . فالخلايا والمثقبيات trypanosomes تنحل بسرعة عندما يخرج السائل النخاعي من الجسم . ويتلف الغلوكوز بسرعة في غياب مواد حافظة كالفلوريد مثلاً .

٢ – كن معتنياً ومقتصداً في العمل . فكثيراً ما تكون كمية السائل النخاعي المتاحة للفحص قليلة . وأخذ النموذج صعب . ولهذا لا تهدر أي جزء منه .

٣ – قد يحتوي السائل على جراثيم مفوَّعة virulent organisms ، فلا تستعمل الممصات بالفم ، بل استعمل دائماً بصلة السلامة safety bulb أو ممصة اليد .

٥–٣ الغلوكوز . الطريقة : الطولويدين أو أكسيداز الغلوكوز

٥–٣–١ المبـدأ

نفس مبدأ الغلوكوز في المصل أو البلازما .

٥-٣-٢ الأجهزة والكيماويات

كما سبق وصفها في الغلوكوز في المصل أو البلازما .

٥-٣-٣ طريقة العمل

كما سبق وصفها في تركيز الغلوكوز في البلازما أو المصل . وقد أوردنا في الصفحتين التاليتين تلخيصاً لقياس الغلوكوز في السائل النخاعي بطريقة الطولويدين **o-toluidine** وطريقة اكسيداز الغلوكوز .

٥-٣-٤ القيم المرجعية

غلوكوز السائل النخاعي في الأفراد الأصحاء : ٢,٥-٤,٠ ممول/ل

وللتحويل من وحدات النظام الدولي إلى الوحدات « القديمة » :

١ ممول/ل × ١٨ = مغ/١٠٠ مل

ملاحظة : حيث أن الغلوكوز في السائل النخاعي يتلف بسرعة بعد أخذ السائل ، فانه من المهم إجراء تقدير الغلوكوز في أسرع وقت ممكن . وفي حالة احتمال حدوث تأخير ، يجب حفظ السائل النخاعي بالأكسالات والفلوريد (انظر القسم ٤-١) .

٥-٣(أ) قياس غلوكوز السائل النخاعي . الطريقة : الطولويدين o-Toluidine

قم بتوسيم أنابيب اختبار تكفي للدفعة ، وتضم كفيء الكاشف (ك) ، والمعيار (م) والشواهد (ش١ ، ش٢) والسائل النخاعي (س ن)

ضع بالممص في الأنابيب ما يلي :

	ك	م	ش١ ، ش٢	س ن
ماء مقطر (مكل)	٥٠	–	–	–
المعيار ، ١٠ ممول/ل (مكل)	–	٥٠	–	–
الشواهد (مكل)	–	–	٥٠	–
السائل النخاعي (مكل)	–	–	–	٥٠
كاشف الطولويدين (مل)	٣,٠	٣,٠	٣,٠	٣,٠

امزج جميع الأنابيب جيداً وغطّها واحضنها في درجة الحرارة ١٠٠°س لمدة ١٢ دقيقة .

برِّدها بسرعة إلى درجة حرارة الغرفة وقس التماص .

مقياس اللون : مرشحة برتقالية ، إيلفورد ٦٠٧ (٦٠٠ نم)

مقياس طيفي : ٦٣٠ نم

استعمل كُفَيْتا جافاً أو اشطف بحمض الأسيتيك الجَمُود واستنضبه جيداً .

اضبط صفر الجهاز على كفيء الكاشف (ك) .

احسب النتائج بالممول/ل .

تحقق من نتائج الشواهد .

٥-٣(ب) قياس غلوكوز السائل النخاعي . الطريقة : أكسيداز الغلوكوز

قم بتوسيم أنابيب منبذة تكفي للدفعة وتضم المعيار (م) والشواهد (ش١ ، ش٢) والسائل النخاعي (س ن) .

ضع بممص في الأنابيب ما يلي :

	م	ش١ ، ش٢	س ن
المعيار ، ١٠ ممول/ل (مكل)	١٠٠	–	–
الشواهد (مكل)		١٠٠	–
السائل النخاعي (مكل)	–	–	١٠٠
كاشف التنغستات الفينولي (مل)	٣,٠	٣,٠	٣,٠

امزج الأنابيب جيداً ثم نبذّها

قم بتوسيم مجموعة ثانية من الأنابيب ، تضم كفيء الكاشف (ك) ، والمعيار (م) والشواهد (ش١ ، ش٢) والسائل النخاعي .

ضع بالممص في الأنابيب ما يلي :

	ك	م	ش١ ، ش٢	س ن
كاشف التنغستات الفينولي (مل)	١,٠	–	–	–
طافية الأنابيب أعلاه (مل)	–	١,٠	١,٠	١,٠
الكاشف اللوني (مل)	٣,٠	٣,٠	٣,٠	٣,٠

امزج الأنابيب جيداً واحضنها في درجة حرارة ٣٧°س لمدة ١٥ دقيقة : ورّجها لضمان التهوية aeration .

أخرجْ الأنابيب من الحمام المائي ، وبرّدها إلى درجة حرارة الغرفة وقس التماص .

مقياس اللون : مرشحة خضراء ، إيلفورد رقم ٦٠٤ (٥٢٠ نم)
مقياس طيفي : ٥١٥ نم
اضبط صفر الجهاز على كفيء الكاشف

احسب النتائج بالممول/ل
تحقق من نتائج الشواهد .

٥-٤ التركيز العددي للكريات البيضاء (تعداد الكريات البيضاء)

٥-٤-١ المبـدأ

قد يحتوي السائل النخاعي على كريات بيضاء بكميات متباينة في بعض الأمراض . ويُفحص السائل لتقدير التركيز العددي للكريات البيضاء (تركيز أو « تعداد » الخلايا البيضاء) باستعمال حجيرة عدّ counting chamber .

٥-٤-٢ الأجهزة والكيماويات

- حمض الاسيتيك الجَمُود . **تحذير** : أكال قوي تداوله بعناية
- زرقة الميتيلين (C.I. 52015)
- حجيرة العد فوكس – روزنتال
- ممص باستور بحلمة مطاطية

٥-٤-٣ الكواشـف

١ – **محلول زرقة المتيلين ، ٣ غ/ل (٣٪ وزن/حجم)** . زِنْ ٠,٣ ثم من زرقة المتيلين وضعه في قارورة . أضف ١٠٠ مل ماء مقطراً . امزج ورشّح .

٢ – **محلول تورك** Turk . أضف ٤ مل من حمض الأسيتيك و ١٠ قطرات من محلول زرقة المتيلين المائي إلى ٢٠٠ مل من الماء المقطر في قارورة كاشف . وامزج جيداً .

٥-٤-٤ طريقة العمل

١ – استر حجيرة العد بالساترة المرافقة .

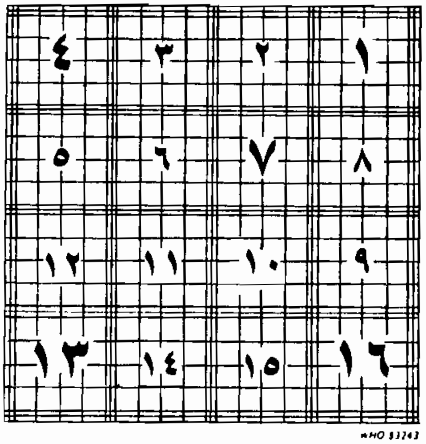
٢ – امزج السائل النخاعي برفق .

٣ – املأ الحجيرة بالسائل :

- دون تخفيف إذ بدا السائل رائقاً ؛
- مخففاً إذا بدا السائل عكراً . في هذه الحالة حضِّر تخفيفاً بنسبة ١ في ٢٠ باستعمال ٥٠ مكم من السائل و ٠,٩٥ مل من محلول تورك . ضعهما بممص في قارورة صغيرة وامزج . املأ الحجيرة بالسائل المخفّف .

٤ – اترك حجيرة العد على النَضَد لمدة ٥ دقائق لتسمح للخلايا بأن تستقر . ضع الحجيرة على رفّ المجهر .

٥ – عُدّ الخلايا في ١ مم^{3} من السائل النخاعي باستعمال الشيئية × ١٠ وحجيرة عد فوكس–روزنتال Fuchs-Rosenthal أو نيوباور Neubaur الموصوفتين في الفقرة ٦ أدناه . وعند كتابة النتائج بوحدات النظام الدولي ، اكتب النتيجة « عدد × ١٠^{٦}/ل » ، والقيمة



العددية لا تتغير . مثال ١٥٠ خلية/مم٣ تكتب في التقرير « ١٥٠ × ١٠٦/ل » .

٦ – (أ) حجيرة عد فوكس روزنتال المسطَّرة مساحتها ٩ مم٢ (الحجيرة المعدلة) أو ١٦ مم٢ . وعمق الحجيرة ٠,٢ مم . عد الخلايا في ٥ من المربعات التي مساحتها ١ مم٢ باستعمال المربعات ١ ، ٤ ، ٧ ، ١٣ ، ١٦ (انظر الرسم) .

وعند استعمال سائل نخاعي غير مخفف لا يلزم عمل حساب . فعدد الخلايا المعدودة يعطي عددها في كل ميليمتر مكعب من السائل النخاعي .

وعند استعمال سائل نخاعي مخفف ، يُضرب عدد الخلايا المعدودة في ٢٠ ليعطي عدد الخلايا في كل مليمتر مكعب من السائل النخاعي .

٦ – (ب) وحجيرة نيوباور المعدّلة لها مساحة مسطرة قدرها ٩ مم٢ وحجمها الكلي ٠,٩ مكل (٠,٩ مم٣) .
وعند استعمال سائل نخاعي غير مخفف ، اضرب الخلايا المعدودة في ١٠ واقسم على ٩ لتحصل على عدد الخلايا/مم٣ في السائل النخاعي .
وعند استعمال سائل نخاعي مخفف اضرب الخلايا المعدودة × ٢٠٠ واقسم على ٩ لتحصل على عدد الخلايا/مم٣ في السائل النخاعي .

٧ – عند استعمال سائل نخاعي غير مخفف ، افحص الخلايا باستعمال الشيئية × ٤٠ للتأكد من أن الخلايا هي كريات بيضاء . فاذا كانت توجد كريات حمراء ، قم بالعد مستخدماً الشيئية × ٤٠ وعد الكريات البيضاء فقط .

٥–٤–٥ القيم المرجعية

أقل من ٥ × ١٠٦ كريات بيضاء في كل لتر (أقل من ٥/مم٣) .

٥–٥ اجمالي البروتين . الطريقة : قياس العكر

٥–٥–١ المبــدأ

يقاس تركيز اجمالي البروتين في السائل النخاعي بتخفيف السائل في ٣٪ من حمض السلفوساليسيليك ومقارنة التماص بموجة طولها ٦٤٠ نم مع تماص معايير البروتين .

٥-٥-٢ الأجهزة والكيماويات

- الزجاجيات
  - قارورة كاشف عنبرية اللون (حجم ١ لتر)
  - ممصات مدرجة (١ مل و ٥ مل و ١٠ مل بتدريج ٠,١ مل)
  - ممصات حجمية (١ و ٢ مل)
  - أنابيب اختبار (١٠٠ × ١٣ مم)
  - حواجل حجمية (١٠٠ مل و ١ لتر)
- مقياس طيفي ، طول الموجة ٦٤٠ نم
- مقياس اللون ، مرشحة حمراء ، إيلفورد ٦٠٨ (٦٦٠ نم)
- الكيماويات
  - كلوريد الصوديوم
  - آزيد الصوديوم . **تحذير** : تداوله بعناية
  - حمض الـ٥-سلفوساليسيليك

٥-٥-٣ تحضير الكواشف

١ - **محلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم** . زن ٩ غ من كلوريد الصوديوم و ٠,٥ غ من آزيد الصوديوم . ضعهما في حوجلة حجمية سعة ١ لتر ، وأكمل إلى اللتر بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لمدة غير محدودة في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٢ - **محلول حمض السلفوساليسيليك ، ٣٠ غ/ل (٣٪ وزن/حجم)** . زن ٣٠ غ من حمض ٥-سلفوساليسيليك وضعها في حوجلة حجمية سعة لتر وأكمل إلى اللتر بالماء المقطر . هذا المحلول ثابت لعدة أشهر في درجة حرارة ٢٠-٢٥°س .

٣ - **محلول معيار البروتين (١ غ/ل)**

(أ) حضِّر جميعة مصل serum pool (حوالي ١٢ مل) مع تجنب النماذج اليرقانية أو المفرطة الشحمية lipaemic أو العكرة . انظر التحذير في القسم ١-٤ عن السلامة الحيوية . قِسْ تركيز اجمالي البروتين بطريقة البيوريت (انظر القسم ٤-١٣) .

(ب) خفّف ١٠,٠ مل من جميعة المصل للوصول إلى تركيز من إجمالي البروتين قدره ١ غ/ل كما يلي :

$$\frac{\text{تركيز إجمالي البروتين في الجميعة}}{٥٠} \times ١٠ = \text{الحجم النهائي لجميعة المصل بعد التخفيف (مل)}$$

مثلاً : تركيز إجمالي البروتين المقيس للجميعة = ٦٧,٠ غ/ل

اذن : $\frac{٦٧}{٥٠}$ × ١٠ = الحجم النهائي لجميعة المصل بعد التخفيف = ١٣,٤ مل .

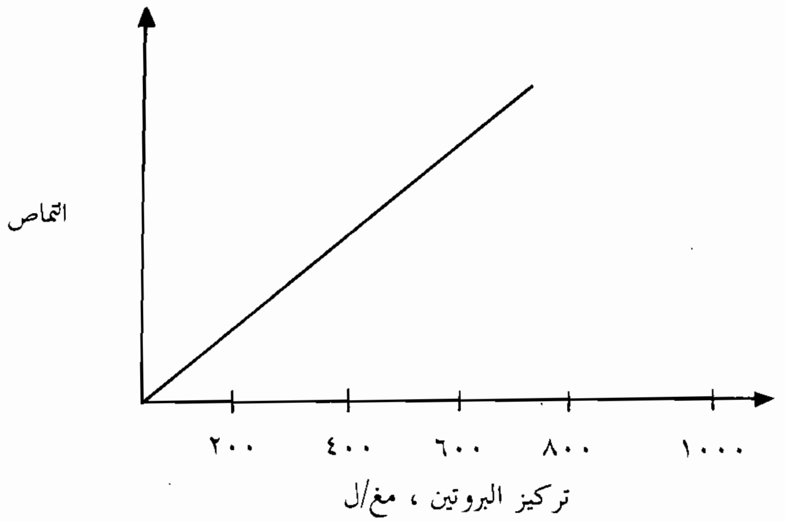
ولهذا : إذا كان تركيز اجمالي البروتين في جميعة المصل ٦٧ غ/ل ، خفِّف ١٠ مل من الجميعة بمقدار ٣,٤ مل من محلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم . هذا المحلول يحتوي على ١ غ من البروتين في كل لتر ، وهو محلول معيار البروتين الشغّال . هذا المحلول ثابت لمدة ٣ أشهر في درجة حرارة ٤-٦°س .

٤ - تحضير مخطط التعيير

حضِّر ، باستعمال محلول معيار البروتين الشغال (١ غ/ل) ، الأنابيب الموصوفة في الجدول أدناه . امزج الأنابيب جيداً بعد إضافة محلول حمض السلفوساليسيليك .

الأنبوب رقم :	١	٢	٣	٤	٥	٦
محلول معيار البروتين الشغال (مل)	صفر	٠,٢	٠,٤	٠,٦	٠,٨	١,٠
محلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم (مل)	١,٠	٠,٨	٠,٦	٠,٤	٠,٢	صفر
محلول حمض السلفوساليسيليك	٣,٠	٣,٠	٣,٠	٣,٠	٣,٠	٣,٠
تركيز البروتين مغ/ل	صفر	٢٠٠	٤٠٠	٦٠٠	٨٠٠	١٠٠٠

بعد إضافة حمض السلفوساليسيليك ، دع الأنابيب لمدة ٥ دقائق ثم اقرأ التماص بموجة طولها ٦٤٠ نم بعد ضبط صفر المقياس الطيفي على الأنبوب رقم ١ . ضع تماص كل أنبوب على المحور العمودي مقابل تركيز البروتين (مغ/ل) على المحور الأفقي .



٥-٥-٤ طريقة العمل

١ - ضع بالممص ٣,٠ مل من محلول حمض السلفوساليسيليك في أنبوب اختبار ، وأضف ١,٠ مل من السائل النخاعي الرائق.(نبِّذه إذا لزم الأمر واستعمل الطافية supernatant) .

٢ - اترك الأنبوب في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ دقائق .

٣ - قس التماص بموجة ٦٤٠ نم بعد ضبط صفر المقياس الطيفي على محلول يحتوي على ٣,٠ مل من محلول حمض السلفوساليسيليك و ١,٠ مل من محلول كلوريد الصوديوم/آزيد الصوديوم .

٥-٥-٥ الحســاب

اقرأ النتائج على مخطط التعيير ودوّن النتيجة بالمغ/ل .

٥-٥-٦ القيم المرجعية

المجال المرجعي لإجمالي البروتين في السائل النخاعي هو :

١٠٠-٤٥٠ مغ/ل (٠,١-٠,٤٥ غ/ل)

٦ - ثبت المراجع

1. Anemia. Fundamental Diagnostic Hematology, CDC Lab. Manual, Evatt, B.L., Lewis, S.M., Lothe, F. & MacArthur, J.R., US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA, and World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1983.
2. Chemistry and Quality Control for District Laboratories, Vazquez, D.A. & Olazabal, R., WHO/LAB/83.9.
3. Education and Training for Clinical Chemistry, Rubin, M. & Lous, P. (eds), published for the International Federation of Clinical Chemistry, Committee on Education and Training in Clinical Chemistry, MTP Press Limited, Lancaster, England, 1977.
4. Preparation of Stabilised Liquid Quality Control Serum, to be used in clinical chemistry, Browning, D., Hill, P., Vazquez, D.A. & Olazabal, R., WHO/LAB/86.4.
5. Guidelines for a Basic Programme for Internal Quality Control of Quantitative Analysis in Clinical Chemistry, Stamm, D., WHO/LAB/81.3.
6. Laboratory Biosafety Manual, World Health Organization, Geneva, 1983.
7. Manual of Basic Techniques for a Health Laboratory, WHO/LAB, 1983.
8. Medical Laboratory Manual for Tropical Countries, Volume 1, 1st ed., Cheesbrough, M., Stephen Austin and Sons Ltd., Hertford, England, 1981, and 2nd ed., 1986 (ELBS 1986), published by Tropical Health Technology Butterworths.
9. Microanalysis in Medical Biochemistry, Wootton, I.D. & Freeman, H., 6th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1982.
10. Practical Guidelines for the Preparation of Quality Control Sera for Use in Clinical Chemistry, Kenny, A.P. & Eaton, R.H., WHO/LAB/81.4.
11. Practical Haematology, Dacie, J.V. & Lewis, S.M., 6th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1984.
12. Principles of Quality Control, Whitehead, T.P., WHO/LAB/76.1.
13. Selected Methods for the Small Clinical Chemistry Laboratory. Selected Methods of Clinical Chemistry, Volume 9, Faulkner, W.R. & Meites, S. (eds), American Association of Clinical Chemistry, Washington, D.C., 1982.
14. Specification for Production/Assembly of Basic Laboratory Equipment. Report on a Group of Experts, WHO/LAB/84.2.
15. Standardized Romanowsky Staining of Blood and Bone Marrow Films, Lewis, S.M. & Roussöe, M., WHO/LAB/86.1.

16. The Principles and Methods of Quality Assurance in Haematology, Lewis, S.M., WHO/LAB/84.3.
17. The Principles of Quality Assurance, Report of a WHO Meeting, EURO, Reports and Studies, 94, 1983.
18. The SI for the Health Progressions, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1977.
19. Working Group on Assessment of Clinical Technologies. Identification of Essential Clinical Chemical and Haematological Tests in Intermediate Hospital Laboratories, Report on a Group of Experts, WHO/LAB/86.2. (In press).

٧ – قائمة بالمشتركين

Dr Nelly de CEDIEL	Colombian Association of Experts in Clinical Laboratory Calle 49, 15-47 Bogotá, Colombia
Dr André DEOM	IFCC/WHO Liaison Officer Laboratoire Central Chimie Hôpital Cantonal Universitaire CH-1211 Genève 4
Dr Peter G. HILL	Department of Clinical Biochemistry Derbyshire Royal Infirmary Derby DE1 2QY, UK
Dr Asim K. SARKAR	Department of Biochemistry Postgraduate Institute of Medical Education and Research Chandigarh 160012, India
WHO Secretariat:	
Dr Dolores A. Vazquez R. Olazabal	Scientist, Health Laboratory Technology WHO, Geneva, Switzerland
Dr Francis Lothe	Formerly Medical Officer Health Laboratory Technology WHO, Geneva, Switzerland