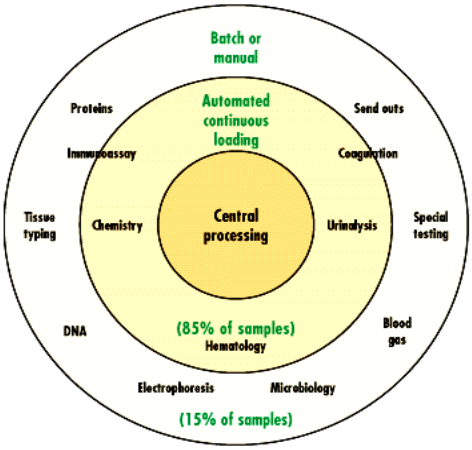
# مراقبة الجودة في المختبر السريري
# Quality Control In Clinical Laboratory

ينبغي على المخبري السريري انتقاء طريقة التحليل المثالية التي تكون مضبوطة accurate، دقيقة precise، حساسة sensitive ونوعية specific. ويفضل أن تكون بسيطة ورخيصة وسريعة التطبيق.

لكن في الممارسة العملية ليس هنالك اختبار مثالي. فالطرق التحليلية تكون خاضعة للإجراءات الصارمة لضبط وضمان الجودة، ومع ذلك يكون هنالك دوماً احتمال لحدوث تبدل في النتيجة. لذلك من الملائم غالباً إجراء مجموعة من الاختبارات المرتبطة بالعينة.

يمكن لأجهزة التحليل الآلية متعددة القنوات أن تنجز أكثر من 20 تحليل في الوقت نفسه وعلى عينة واحدة. ويوضح الشكل التالي أهم الاختبارات التحليلية التي تُجرى في المختبر السريري.



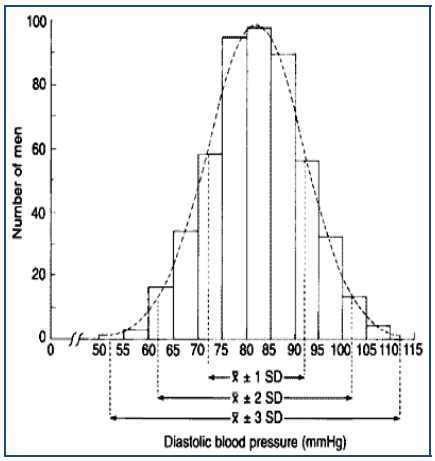

العمليات التحليلية التي تُجرى في المختبر السريري.

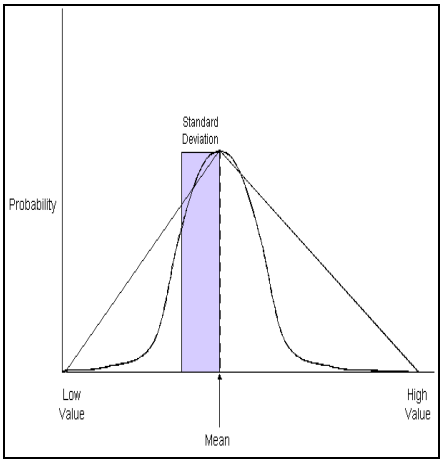
لا بد من الاستعانة ببعض المفاهيم الاحصائية لتأكيد مدى موثوقية الطريقة المستخدمة في التحليل السريري. وهنا يمكن استخدام الاحصائيات الوصفية Descriptive statistics لإبراز أهمية معطيات مجموعة واحدة من التحاليل؛ أو استخدام الاحصائيات الاستدلالية أو الاستنتاجية Inferential statistics لمقارنة المعطيات بين مجموعتين أو أكثر.

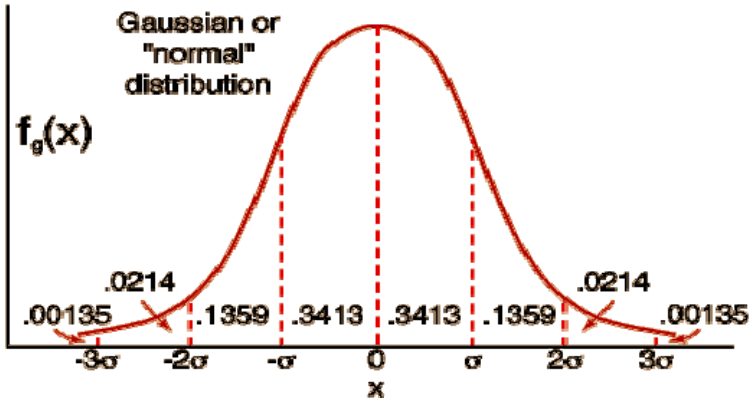
*– الاحصائيات الوصفية للمجموعات المؤلفة من ملاحظات وحيدة:*

أكثر الطرق فائدة في تمثيل المعطيات هنا تلخيصها ضمن مخططات مُنَسِّج إحصائي histogram، كتمثيل تراكيز المادة المقاسة على محور السينات وتمثيل تكرارية القياس على محور العينات. حيث أن القياسات المتكررة للنموذج نفسه يمكن أن تختلف تبعاً لاختلاف الكواشف وطريقة العمل والشروط المحيطية التي يجري فيها العمل كاختلاف درجة الحرارة مثلاً.

وينبغي الحصول على شكل جرسي bell shape أو توزع غوس gaussian distribution حين معايرة أحد المتثابتات الكيميائية الحيوية لدى مجموعة من الأفراد الأسوياء.




يمكن أن توصف ملاحظات غوس بالإحصائيات التي تلخص توضعها وتوزعها. والاختبار الاحصائي الأكثر شيوعاً الذي يلخص التوضع هو المتوسط mean، والذي يُحسب بقسمة مجموع الملاحظات على عددها.

فإذا كانت الملاحظات $X_1$، $X_2$، $X_3$، -----، $X_n$ فإن المتوسط $\bar{X}$ هو $\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + --- + X_n}{n}$

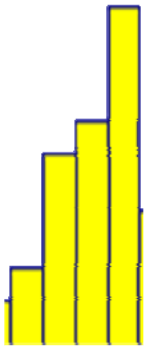
$$\bar{X} = \frac{\sum Xi}{n}$$

هنالك أيضاً ثلاثة قياسات أخرى للتوضع شائعة الاستخدام وهي: الناصف median، الطرز mode، الشريحة المئوية percentile.

– **الناصف median** هو القيمة التي تقسم الملاحظات إلى مجموعتين، تحتوي كل منها على أعداد متساوية من الملاحظات. والقيم في المجموعة الواحدة تكون أصغر من الناصف والقيم في المجموعة الأخرى تكون أكبر من الناصف. وإذا رُتبت الملاحظات بترتيب متزايد وكانت هنالك ملاحظات بأرقام فردية فإن الناصف هو الملاحظة التي في المنتصف.

– **الطرز mode** وهو الملاحظة الأكثر تكراراً، ومن أجل توزع غوس فإن قيم المتوسط، والناصف، والطرز متساوية تقريباً، ولذلك يُكتفى عادة بقيمة المتوسط. أما المعطيات غير التي تتبع توزع غوس فإنه ينبغي تحديد كل من المتوسط والناصف والطرز لها.

– **الشريحة المئوية percentile** وهي قيمة الملاحظة التي يقع تحتها جزء معين من الملاحظات والتي يمكن الحصول عليها من منهج التكرار النسبي التراكمي cumulative-frequency histogram، وهو مخطط بياني فيه عدد الملاحظات التي تساوي أو تقل عن قيمة معينة تكون ممثلة بيانياً مقابل القيمة المعينة.



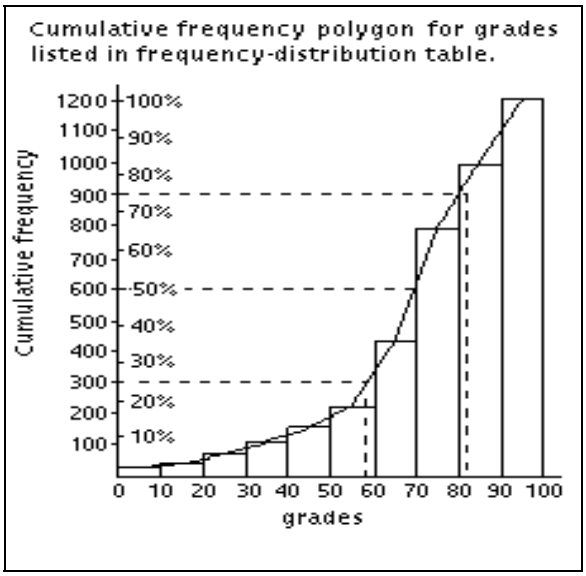
Frequency Histogram

**The shape of a cumulative frequency histogram will always have the rectangular bars getting bigger as you move to the right.**

**Example: Start with the smallest interval (75-79)**

**and add. 4 + 6 = 10:**
**10 + 3 = 13:**
**13 + 2 = 15.**
**15 is the total number of data entries.**

| Math Scores | Frequency | Cumulative |
|---|---|---|
| 75 -79 | 4 | 4 |
| 80 -84 | 6 | 10 |
| 85 -89 | 3 | 13 |
| 90 - 95 | 2 | 15 |



**الانحراف المعياري standard deviation** هو المدلول الاحصائي الأكثر استخداماً لوصف تشتت مجموعات الملاحظات الوحيدة. وهو يُمثل عادة بالرمز S وهو لمجموع القيم $X_1$، $X_2$، $X_3$، ------، $X_n$ يُعطى بالعلاقة التالية:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

هنالك طريقة بديلة لحساب الانحراف المعياري ولا تحتاج إلى حساب قيمة المتوسط، وهي تُمثّل بالمعادلة التالية:

$$s = \sqrt{\frac{n_t(\Sigma x_i^2)_t - (\Sigma x_i)_t^2}{n_t(n_t - 1)}}$$

هنالك طريقة أخرى للتعبير عن الانحراف المعياري وهي معامل الاختلاف coefficient of variation، ويُعطى بالعلاقة التالية: CV% = (SD/ $\bar{X}$ )100

ويُسهّل الـ CV مقارنة الاختلافات المعيارية لنتائج الاختبار المعبر عنها بوحدات وتراكيز مختلفة.

– الانحراف المتوسط المطلق mean absolute deviation (MAD)

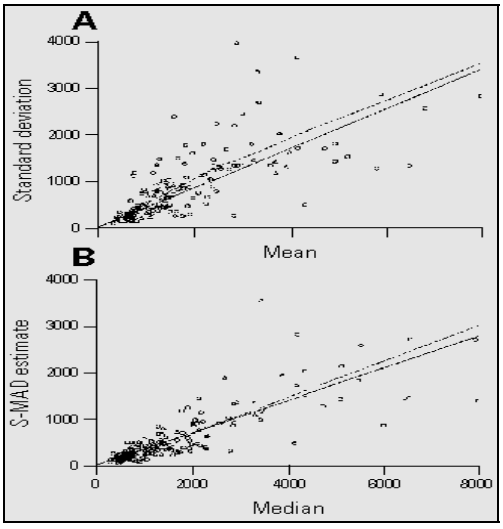
$$M.A.D. = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} f_i \, |x_i - \bar{x}|,$$

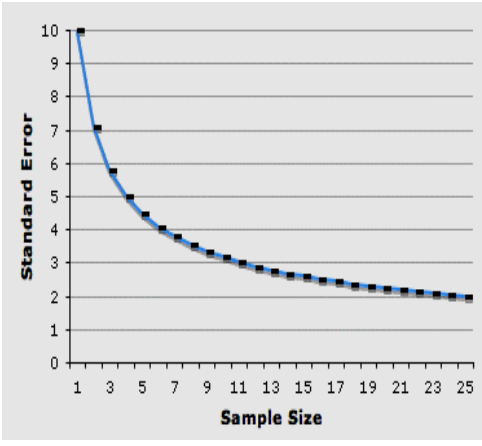
حيث N هي حجم العينة، xi قيم العينات، $\bar{X}$ متوسط القيم، fi هو التواتر المطلق.

– وهنالك الانحراف المعياري للمتوسط standard deviation of the mean، وهو يدعى أيضاً الخطأ المعياري للمتوسط standard error of the mean (SEM)، وهو يُحسب تبعاً للمعادلة التالية:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

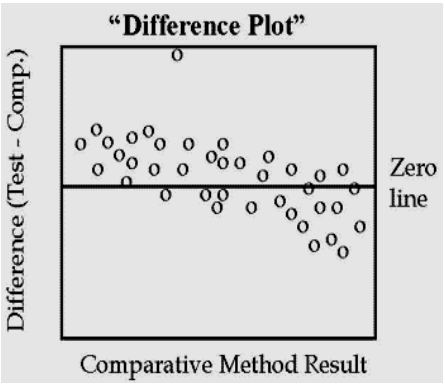
حيث S هي الانحراف المعياري و N عدد العينات.

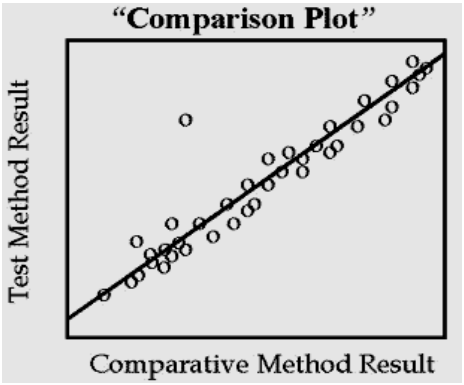



- ***الاحصائيات الوصفية للمجموعات المؤلفة من ملاحظات مزدوجة:***

– إن الخطوة الأكثر غنى بالمعلومات لتقييم أية طريقة تحليلية جديدة هي مقارنتها بطريقة تجريبية معتمدة، ويكون المخطط البياني هو الأفضل لتلخيص مقارنة الطريقتين المزدوجتين. حيث تُمثّل قيم الطريقة القديمة على محور السينات X-axis، وتمثّل قيم الطريقة الجديدة على محور العينات Y-axis.



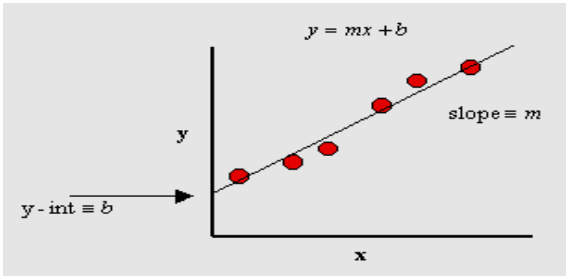




- **التقهقر أو التحوّف الخطي linear regression يعطي عادة قياسات غير منحازة للميل و محور الاعتراض Y.**

– بافتراض أن مجموعة من المعطيات تربط فيما بينها علاقة خطية، فإنه من غير الضروري رسم منحنى المعطيات بالترتيب لتعيين الثابتتين *m* (slope) و *b* (y-intercept) بالمعادلة التالية: $y = mx + b$ ، وبدلاً من ذلك يمكن أن نطبق معالجة إحصائية تُعرف بالتقهقر أو التحوف الخطي linear regression للمعطيات وتعيين الثابتتين.

Sample data.

| x | y |
|---|---|
| 1.0 | 2.6 |
| 2.3 | 2.8 |
| 3.1 | 3.1 |
| 4.8 | 4.7 |
| 5.6 | 5.1 |
| 6.3 | 5.3 |




ومع وجود مجموعة من المعطيات $(x_i, y_i)$ مع عدد من نقاط هذه المعطيات N فإنه يمكن تعيين المنحدر slope والمعترضات Y وعلاقة الارتباط r، وذلك باستخدام المعادلات التالية:

$$m = \frac{n\sum(xy) - \sum x \sum y}{n\sum(x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y - m\sum x}{n}$$

$$r = \frac{n\sum(xy) - \sum x \sum y}{\sqrt{\left[n\sum(x^2) - (\sum x)^2\right]\left[n\sum(y^2) - (\sum y)^2\right]}}$$

- ***الاحصائيات الاستدلالية أو الاستنتاجية Inferential statistics***

وهي تستخدم لمقارنة المتوسطات أو الانحرافات المعيارية لمجموعتين من المعطيات.

– فاختبار t-test يُستخدم لتعيين في ما إذا كان هنالك فرق ذو أهمية يُعتد بها إحصائياً بين متوسطين أوانحرافين معياريين لمجموعتين من المعطيات.

we can only estimate it with the sample standard deviation *S* and transfer the X into *T* which does not have a standard normal distribution. *T* follows what is called Student's distribution.

$$T = \frac{\overline{X} - \mu}{S/\sqrt{n}}$$ ~ **t-distribution** **μ = mean**

**we assume that we know the standard deviation (σ) of the population** and transferred the X into ***Z*** which is standard normal distribution and use the z-value to estimate the confidence intervals for the population mean μ

$$Z = \frac{\overline{X} - \mu}{\sigma/\sqrt{n}}$$ ~ standard normal distribution

**The formula for the two sample t-test is:**

$$T = \frac{\overline{X} - \overline{Y}}{S_p\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

- **اختبار F-test يستخدم لمقارنة حجوم الانحرافات المعيارية لطريقتين.** وهو يساوي *Fcalc* $= (s_L)^2/(s_S)^2$ حيث $s_L$ هو الانحراف المعياري الأكبر و $s_S$ هو الانحراف المعياري الأصغر.
- **درجات الحرية Degrees of freedom:** ويقصد بها التمركز الرئيسي للقياسات الإحصائية للعينات المأخوذة من مجموعة من السكان.

فإذا كان الانحراف المعياري في المجموعة هو $\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-\mu)^2}{n}}$

x is a value from the population, m is the mean of all x, n is the number of x in the population, ∑ is the summation.

فإن قياس الانحراف المعياري يمكن أن يُحسب من عينة عشوائية كما يلي:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

x is an observation from the sample, x-bar is the sample mean, n is the sample size, ∑ is the summation.

- When this principle of restriction is applied to regression and analysis of variance, the general result is that you lose one degree of freedom for each parameter estimated prior to estimating the (residual) standard deviation.

- Another way of thinking about the restriction principle behind degrees of freedom is to imagine contingencies. For example, imagine you have four numbers (a, b, c

and d) that must add up to a total of m; you are free to choose the first three numbers at random, but the fourth must be chosen so that it makes the total equal to m - thus your degree of freedom is three.

- "there are $n - 1$ degrees of freedom for error."

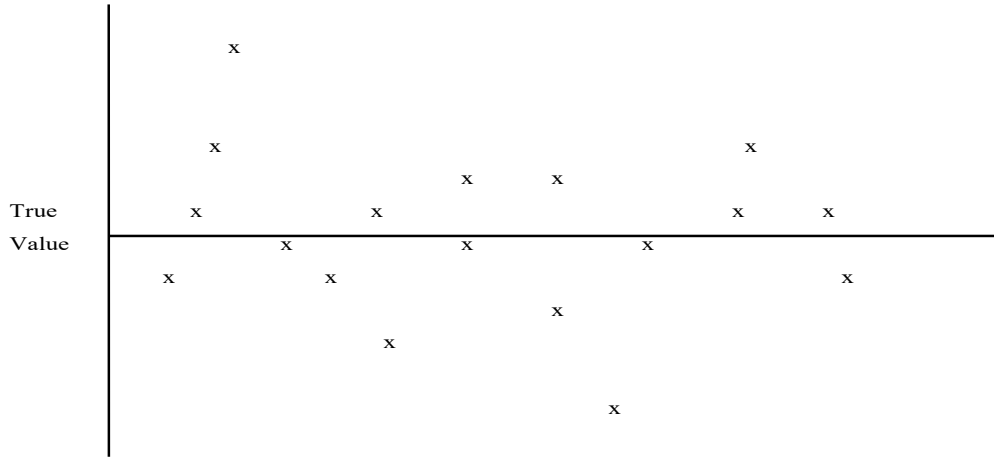
## مصادر الخطأ Sources of error

- إدخال المعطيات المطلوبة، مثل المعياريات المستخدمة، وقيم المعاورة calibration، والثوابت الفيزيائية؛
- خصائص ذاتية تعود للكمية المقاسة؛
- استخدام الأجهزة ، والمضبوطية ، والتكرارية؛
- أخطاء الملاحظة، أخطاء القراءة، الأخطاء الفادحة، انتقاء الجهاز، أخطاء التحليل والأخطاء التي لا يمكن تفاديها؛
- البيئة الخارجية التي تؤثر على المقايسة؛
- النظريات المفترضة في الطرق الرياضية وعمليات التقريب التي تتخللها.

## الخطأ العشوائي Random Error

- هو الخطأ الذي يختلف بطريقة لا يمكن توقعها، من التوقيع إلى الحجم الكبير للخطأ، وذلك عند إجراء عدد ضخم من المقايسات الكمية ذاتها ضمن ظروف متماثلة.
- تنشأ الأخطاء العشوائية من بعثرة خاصة للنتائج لأية طريقة اختبار وعدم إمكانية حصرها بالتصحيحات المطبقة. ومن الصعب التخلص من الأخطاء العشوائية إلا أن التكرار ينقص من تأثير هذه الأخطاء العشوائية.
- كأمثلة على الأخطاء العشوائية نذكر: سحب العينة بالممص وتبديل مدة الحضن.
- ويمكن إنقاص الأخطاء العشوائية بالتدريب، والمراقبة، والالتصاق أكثر بطرق العمل القياسية المعتمدة وإجراء المعياريات.

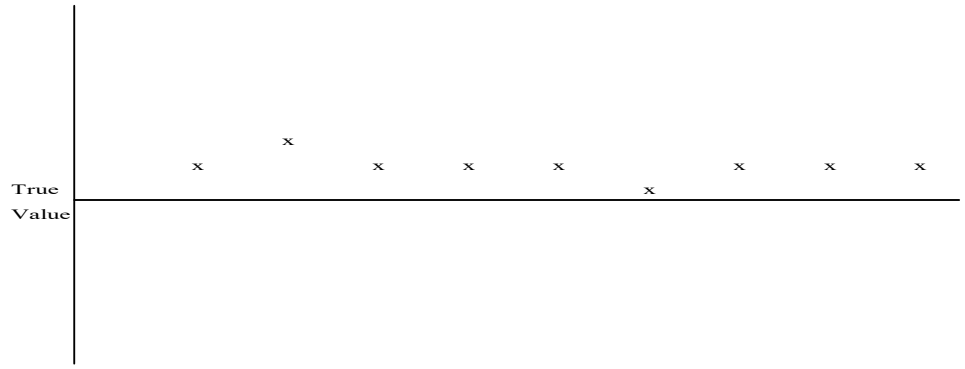
**Random Errors**




## الخطأ المنهجي Systematic Error

- An error which, in the course of a number of measurements of the same value of a given quantity, remains constant when measurements are made under the same conditions, or varies according to a definite law when conditions change.
- Systematic errors create a characteristic bias in the test results and can be accounted for by applying a correction.
- Systematic errors may be induced by factors such as variations in incubation temperature, blockage of plate washer, change in the reagent batch or modifications in testing method.

**Systematic Errors**




**برنامج مراقبة الجودة الداخلي للاختبارات المصلية**

**Internal Quality Control Program for Serological Testing**

- يعتمد برنامج مراقبة الجودة الداخلي على استخدام نماذج مراقبة جودة داخلية internal quality control specimens (IQC)، وعلى رسوم بيانية تدعى Shewhart Control Charts، وعلى استخدام الطرق الإحصائية لتفسير النتائج.

- نماذج مراقبة الجودة الداخلية Internal Quality Control Specimens

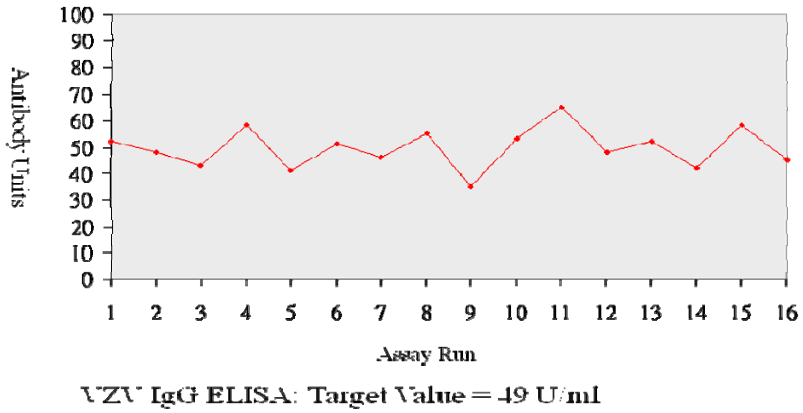
تتألف نماذج الـ IQC إما (1) من مصول المرضى المراجعين للمختبر (عينات سريرية مفردة أو بشكل جميعة)، أو (2) معياريات مصل داخلية مع قيم تقع ضمن المجالات السريرية الهامة لكل منها.

## Shewhart Control Charts

A Shewhart Control Chart depend on the use of IQC specimens and is developed in the following manner:-

- Put up the IQC specimen for at least 20 or more assay runs and record down the O.D./cut-off value or antibody titre (whichever is applicable).
- Calculate the mean and standard deviations (s.d.)
- Make a plot with the assay run on the x-axis, and O.D./cut-off or antibody titre on the y axis.
- Draw the following lines across the y-axis: mean, -3, -2, -2, 1, 2, and 3 s.d.
- Plot the O.D./cut-off obtained for the IQC specimen for subsequent assay runs
- Major events such as changes in the batch no. of the kit and instruments used should be recorded on the chart.

**Shewhart Chart**




VZV IgG ELISA: Target Value = 49 U/ml

### Warning rules قواعد تحذيرية

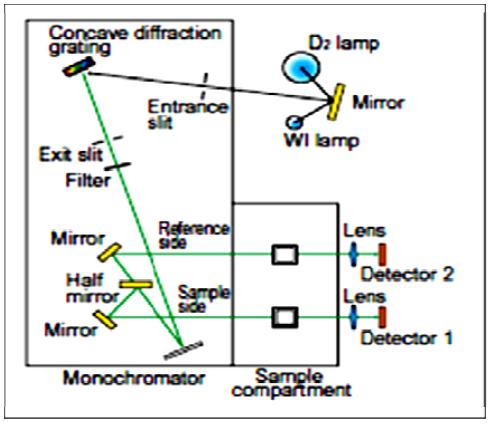
- Warning $1_{2SD}$ : It is violated if the IQC value exceeds the mean by ± 2SD. It is an event likely to occur normally in less than 5% of cases.
- Warning $2_{2SD}$ : It detects systematic errors and is violated when two consecutive IQC values exceed the mean on the same side of the mean by ± 2SD.
- Warning $3_{1SD}$ : It is violated if four consecutive IQC values exceed the same limit (mean ± 1SD) and this may indicate the need to perform instrument maintenance or reagent calibration.

### Mandatory rules قواعد إجبارية

- Mandatory $1_{3SD}$ : It is violated when the IQC value exceeds the mean by ±3SD. The assay run is regarded as out of control.
- Mandatory $R_{4SD}$ : It is only applied when the IQC is tested in duplicate. This rule is violated when the difference in SD between the duplicates exceeds 4SD.
- Mandatory **10x** : This rule is violated when the last 10 consecutive IQC values are on the same side of the mean or target value.

## Analytical Techniques and Instrumentation الطرق التحليلية والأجهزة في المختبر السريري

– مقياس الطيف الضوئي مزدوج طول الموجة




**In double beam design, the energy of the light source is divided into two with a half mirror so that one passes through the reference side, and the other through the sample side, which is unavailable with the single beam design. Since the reference-side energy is also incident on a detector, photometry is carried out on the basis of this signal. Therefore, an energy change in the light source can be compensated to ensure stable measurement for a long time.**

## الطرق التحليلية واستخدام الأدوات Analytical Techniques and Instrumentation

- Spectrophotometry and Photometry قياس الضوء الطيفي والقياس الضوئي
- Electrochemistry الكيمياء الكهربائية
- Electrophoresis الرحلان الكهربائي
- Chromatography الاستشراب
- Analytical Techniques for POCT (Point of Care Testing)

الطرق التحليلية للاختبار في وحدة العناية (بجانب سرير المريض)

## • مبادئ الكيمياء السريرية الآلية Principles of Clinical Chemistry Automation

### مبادئ التحليل الآلي Steps in Automated Analysis

- Specimen preparation and identification تحضير النموذج وتعيين هويته
- Specimen measurement and delivery قياس النموذج وايتائه
- Reagent systems and delivery المجموعات الكاشفة وايتائها
- Chemical reaction phase طور التفاعل الكيميائي
- Measurement phase طور القياس
- Signal processing and data handling عملية معالجة الإشارة ومعالجة المعطيات

## • بعض الأجهزة المستخدمة في المختبر السريري Clinical Lab Instrumentation

جهاز تحليل الأحماض الأمينية Amino Acid Analysis

**يعتمد مبدأ الأجهزة الآلية المستخدمة في تحليل الأحماض الأمينية على حلمهة السلسلة عديدة الببتيد بحمض قوي وبدرجة حرارة 110 م° ، ومن ثم تُفصل الأحماض الأمينية بالاستشراب على عمود باستخدام مبادل شوارد ion- exchange column، وتحدد كمية الأحماض الأمينية المفصولة بتسخينها مع كاشف النينهيدرين ninhydrin الذي يعطي مركبا بلون بنفسجي مع الأحماض الأمينية .**

### تحليل الأحماض الأمينية Amino Acid Analysis

- تؤخذ عينات التحليل بعد صيام 6- 8 ساعات.
- تؤخذ عينة البلازما الهيبارينية، ويتم تجنب الصفيحات platelets والكريات البيضاء leukocytes.

- تضم اختبارات التقصي التشخيصية البدئية الاستشراب على الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography.
- تعتمد الاختبارات الكمية لمراقبة سير العلاج أو لتأكيد التشخيص البدئي، على فصل الأحماض الأمينية وتحديد كميتها بالاستشراب chromatography على مبادل شوارد هابطي cation- exchange، أو باستخدام الاستشراب السائلي الرفيع الإنجاز HPLC.
- التشخيص الدقيق لأحد الأحماض الأمينية أو أحد مستقلباتها، يتم باختبارات مكملة للاستشراب الغازي السائل GLC والمطياف الكتلوي MS.
- يمكن معايرة آزوت الأحماض الأمينية في البلازما بالفورمول أو بقياس الآزوت المتشكل بتفاعل الحمض الأميني مع الآزوت، أو بطريقة التفاعل مع النهيدرين غير النوعية.

## اعتلالات الأحماض الأمينية Aminoacidopathies

هي اضطرابات وراثية نادرة rare inherited disorders لاستقلاب الأحماض الأمينية.

* فينيل كيتون يوريا Phenylketonuria (PKU). (نقص أو غياب فاعلية إنزيم PAH).

* الألكابتون يوريا Alkaptonuria (نقص في homogentisate oxidase).

* داء بيلة شراب القيقب Maple Syrup Urine Disease (نقص في branched-chain α-ketoacid decarboxylase).

* هوموسيستين يوريا Homocystinuria (ضعف فاعلية cystathionin β- synthase ، لها دور في اصطناع الـ Cysteine اعتباراً من الـ Methionine).

* يوريا أحماض أمينية كلوية المنشأ Renal Amino acid Urea (إما لا نوعية معممة تنجم عن تخرب غير نوعي في الأنابيب الدانية وإما نوعية كبيلة السيستين).

### الرحلان الكهربائي Electrophoresis

الرحلان الكهربائي electrophoresis، هو طريقة فصل كيميائية حيوية لفصل وتحديد خصائص جزيئات مشحونة.

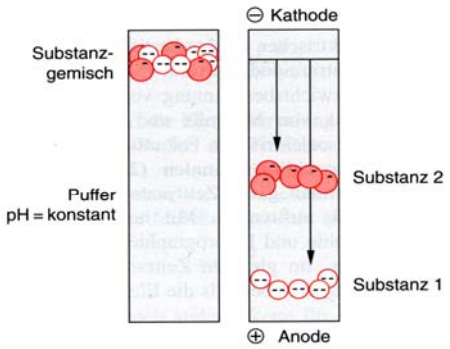
- **تطبيقات الرحلان الكهربائي Applications**

- أداة بحوث كيميائية حيوية وبيولوجية Biological and biochemical research tool,
- له أهمية صيدلانية في بحوث كيمياء البروتين Pharmacy, Proteomics, protein chemistry
- له أهمية في الطب الشرعي forensic medicine،
- له أهمية في الطب البيطري Veterinary medicine،
- له أهمية في مراقبة الطعام Food control،
- له أهمية في البيولوجية الجزيئية Molecular biology.

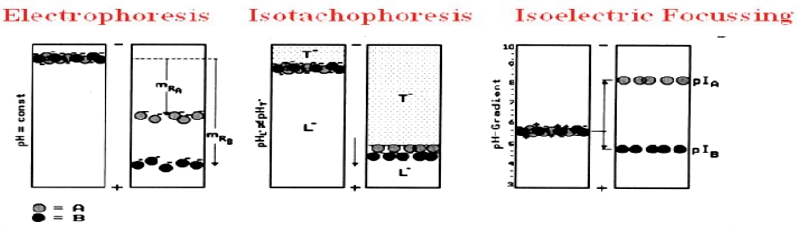
**المبدأ:** فصل الجزيئات المشحونة إلى أقسام تبعاً للشحنة الكهربائية الصافية، ولحجمها، ووزنها الجزيئي.

ويُفصل مزيج الأقسام بشكل أجزاء منفردة.

والأجزاء المنفصلة يمكن أن تكون: جزيئات، خلايا، حموض نووية، بروتينات، ببتيدات، أحماض أمينية، أدوية، أحماض وأسس عضوية، أنيونات Anions و كاتيونات Cations لا عضوية.




## Three Basic Different Electrophoretic Procedures




**Homogenous Buffer Systems**

**Electrophoresis in:**

1. free solution
2. supporting media
   - paper, cellulose acetate folio
   - starch gel, agarose gels
   - polyacrylamide gels

**Exotic procedures**

equeal velocity electrophoresis
discontinuous buffer system

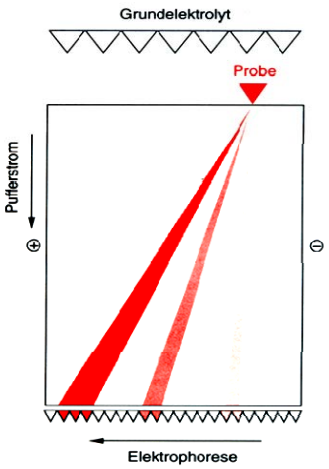
**pH-gradients**

Isoelectric point
ampholytic compounds
proteins, peptides
focussing

## 1. Electrophoresis in Free Solution

**Principle: continuous procedure**
**sample und buffer flow is vertical to the electric field and to the separation direction.**

**Applications: soluble compounds**
**cells, viruses, bacteria**

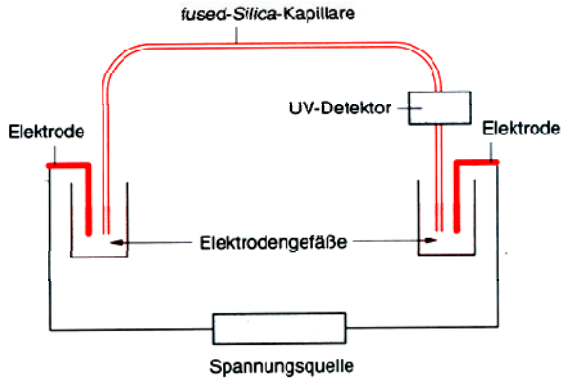


## 1. Electrophoresis in Free Solution

**Capillary electrophoresis**

**Principle:** 20-30 cm capillare
Ø 50-100 µm
potential 30 kV
power supply 10-20 µA

**Application:** Analytical methods
Micropreparation
Sequencing
Mass spectroscopy




## 2. Electrophoresis in Supported Media

**Paper:**

high molecular polysaccharides, large pores

Cellulose acetat folio

only charge dependent, clinical analytic

### Starch gel:

hydrolysed potato starch, not reproducible gels

### Agarose gels:

polysaccharides from red sea algen, after boiling gelation starts during cooling down, polysaccharides helices.

pores: 150 nm 1% gel, 500 nm 0,16% gel not toxic, easy to prepare, horizontal gel immuno electrophoresis.

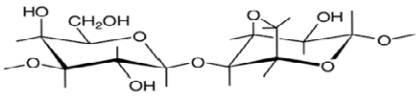
### Polyacrylamide gel:

chemical and mechanical stable, monomeres are toxic pores (5-50 nm), good sieve effects, gels formed by copolymerization of acrylamide and N`,N-methylen bisacrylamide.

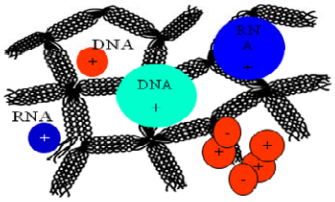
## 2. Electrophoresis in Supported Media

**Non-restrictive gels**
**0,16% gel: pores 150-500 nm**
Mobility is only dependent on the charge of the molecule
clincal routine: serum proteins
Immuno electrophoresis
affinity electrophoresis

**Agarose-gel**



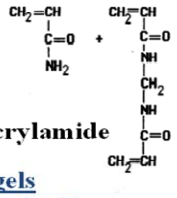
**Restrictive gels**
**1% gel: pores 150 nm**
protein aggregates, DNA- und RNA-molecules and fragments



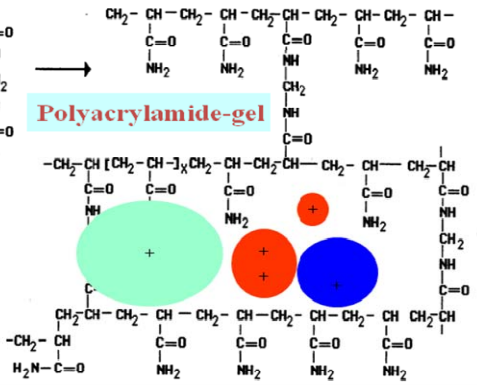

## 2. Electrophoresis in Supported Media

**Acrylamide**

**toxic**



**Methylen bisacrylamide**



**Polyacrylamide-gel**

**Polyacrylamide-gels**
chemical and mechanical stable
good sieve effects,
Acrylamide is toxic,
pores width limited (800 nm),
gels formed by
copolymerisation with
methylen bisacrylamide

**Restrictive gels**
small pores: 5- 30 nm
mobility dependent on charge
and molecular size

## 2. Electrophoresis in Supported Media

**Restrictive Agarose gels**

**For large molecules like protein aggregates, DNA- and RNA-molecules and fragments**

**"Submarine" standard technique for nucleic acids separation**

Stained by ethidium bromide, very toxic
MSDS sheets: weare gloves

## القيم السوية Normal Values لبروتينات المصل

بروتينات المصل الكلية Total Serum Proteins: 5.4− 8.6 غ/د ل.

الألبومين Albumin : 2.6− 5.6 غ/ دل.

الغلوبلين Glubolin : 1.9− 3.5 غ/ د ل.

**يزداد البروتين الكلي في:** الورم النقوي المتعدد Multiple Myeloma، زيادةالغلوبلين الكبروي في الدم Macroglobulinemia، الساركوئيد Sarcoidosis.

**ينقص البروتين الكلي في:** داء هودجكن Hodgkin's disease، نقص الغلوبلين غاما في الدم Hypogammaglobulinemia، القرحة الهضمية Peptic Ulcer، التهاب المرارة الحاد Acute Cholecystitis، النفروز Nephrosis، فرط ضغط الدم الأساسيEssential hypertension ، فشل القلب الاحتقاني Congestive heart failure.

**يزداد الألبومين في:** التجفاف Dehydration، التسريب الوريدي للألبومين.

**ينقص الألبومين في:** سوء التغذية Malnutrition، متلازمات سوء الامتصاص Malabsorption Syndromes، الحمل Pregnancy، فرط الدرق Hyperthyroidism، الرضح Trauma، الخمج Infection، الحروق Burns، إعطاء سوائل في الوريد IV fluids، العوز الولادي Congenital deficiency.

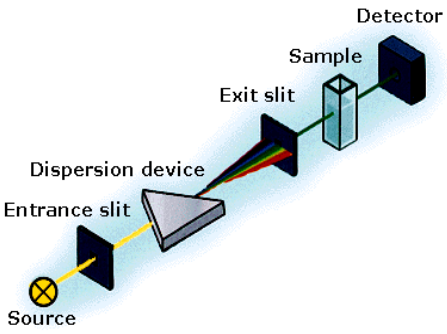
## مقياس طيف الامتصاص الذري Spectrophotometer Atomic Absorption

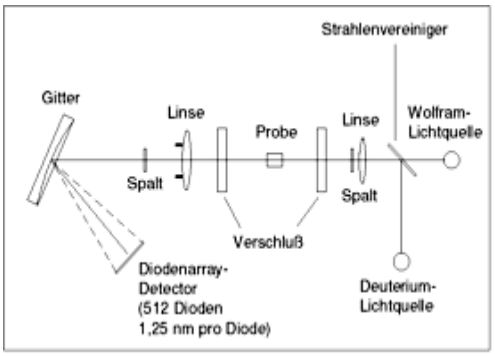
يستخدم هذا الجهاز لقياس التركيز بكشف امتصاص الاشعاع الكهربائي المغناطيسي بواسطة الذرات atoms بدلا من الجزيئات molecules.

ينبغي أن تحتوي العينة المحللة على معدن مرجع بحالة ذرية متبخرة. وبشكل عام يمكن تحقيق هذا باستخدام حرارة اللهب لتحطيم الروابط الكيميائية وتشكيل الذرات الحرة غير المثارة.

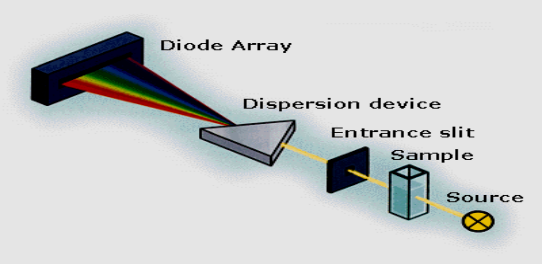
تُعد مقايسة طيف الامتصاص الذري طريقة حساسة ونوعية. وهي تُستخدم روتينياً لقياس تركيز المعادن الزهيدة trace elementsالتي ليس من السهل إثارتها.

## مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer



قياس الطيف الضوئي spectrophotometry طريقة يستخدمها معظم العاملين في العلوم. سواء من أجل تأكيد هوية المركب أو من أجل تحديد كمية الجزء المقاس. ويمكن قياس الطيف الضوئي في الطيف فوق البنفسجي ultraviolet أو المرئي visible. ولقد تطور قياس الطيف الضوئي عبر طريق طويل منذ أن قام الدكتور Arnold Beckman بتركيب الجهاز الأصلي في عام 1940. وهنالك أجهزة مقياس طيف ضوئي حديثة قادرة على قياس الطيف الضوئي في المجالين المرئي وفوق البنفسجي.




يستخدم UV/Vis spectrophotometer مصدرين للضوء: a- deuterium arc lamp من أجل الشدة المتشكلة في المجال فوق البنفسجي UV(190 to 380 nm)، و b- a tungsten-halogen lamp من أجل الشدة المتشكلة في الطيف المرئي visible spectrum (380 to about 800 nm).

ويُبرهن على الخطية Linearity عندما ينجم عن التبدل في نتائج التركيز منحنى معايرة بخط مستقيم، بحيث يتبع قانون Beer. ويمكن التحقق من الخطية باستخدام محاليل ملونة تُمدد بعناية، وذلك باستخدام طول موجة الامتصاص الأعظم لذلك اللون.

## • قياس غازات الدم Blood Gases

هنالك مكونان عريضان في الدم يشكلان النافذة التنفسية والاستقلابية:

- pH وهي تعبير لغاريتمي لتركيز شاردة الهيدروجين، وحموضة وقلوية الدم. وPH الدم الشرياني السوية هي 7.4. وهنالك مجال ضيق لقيم الـ pH (7.35 – 7.45) الخاصة بالجسم البشري، ونظامه المعقد للأفعال الاستقلابية التي تحدث داخله. وإن قيم pH أقل من 7 وتزيد على 7.6 تكون غير ملائمة للحياة.

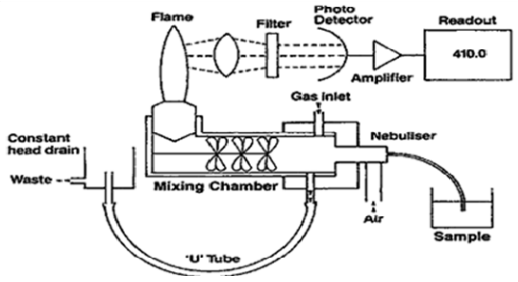
- $HCO_3^-$ تُشتق من معالجة محلل غازات الدم لمعادلة Henderson-Hasslebach. وإن أي تناقص غير معاوض في $HCO_3^-$ يمكن أن تسبب تراجعاً في الـ PH. وينجم عن زيادة $HCO_3^-$ تقلون في الدم. وأي من الحالتين قد تكون مهددة للحياة. وإن الـ $HCO_3^-$ الناقص ينجم عادة عن فشل كلوي أو فشل عضو أعظم، أو الداء السكري غير المراقب. بينما زيادة $HCO_3^-$ تكون أكثر ندرة، وهي عادة نتيجة إعطاء بعد الأدوية غير الملائمة، كما هو الحال مع بعض أنواع المدرات، أو زيادة تناول الـ $NaHCO_3$.

- $pCO_2$ يمكن قياس قيمته مباشرة بواسطة الكترود $CO_2$ وقيمة $CO_2$ الزائدة تكون غالباً نتيجة الفشل التنفسي، أما القيمة الناقصة فتنجم عن فرط التهوية المُحرّض بالحماض الاستقلابي metabolic acidosis. والقيمة السوية لـ $pCO_2$ هي 40 mmHg.

- $pO_2$: يُقاس الضغط الجزئي للأكسجين في الدم مباشرة بواسطة الكترود $O_2$ وتبلغ القيمة السوية بين 85 و100. وتنجم زيادة الـ $pO_2$ عن إعطاء الأكسجين بكمية كبيرة. وينجم نقص الـ $pO_2$ عن عدد المشاكل القلبية الرئوية والتنفسية.

## مقياس الطيف اللهبي Flame Photometer

**Components of a modern Flame Photometer**




يُستخدم مقياس الضوء اللهبي لتعيين تراكيز الصوديوم Sodium، والبوتاسيوم Potassium، والليثيوم Lithium، بواسطة مراشح داخلية قابلة للتبديل. كما يمكن استخدامه في مقايسة الكالسيوم Calcium، والباريوم Barium في مجالات صناعية مختلفة.

وفي المجالات السريرية أصبح من الممكن قراءة تراكيز الصوديوم والبوتاسيوم والليثيوم مباشرة وبسهولة من خلال أجهزة مقياس ضوء لهبي متطورة.

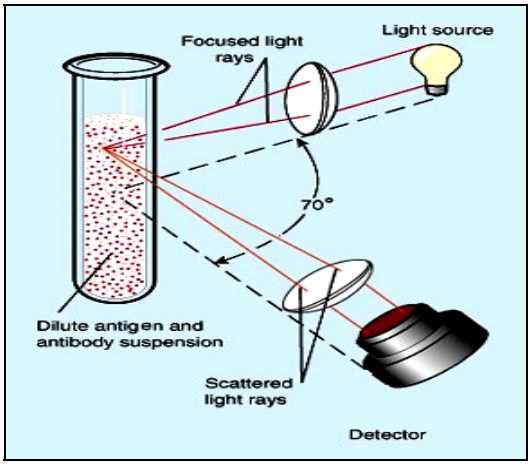
تُرذ العينة السائلة ضمن مرذاذ، وتتبخر ممتزجة بالهواء والوقود في غرفة المزج، ومن ثم تمتزج الحلالة الهوائية بالغاز، حيث يتبخرمحتواها من الماء، وفقط جزيئات الهيدروكسيد أو الأكسيد يمكن أن يتم تلقيمها للقياس ضمن اللهب.

ومن الجانب الطاقي، تنفصل الالكترونات بالتسخين بحرارة اللهب، وعندما تعبر هذه الأنواع المشحونة بالطاقة الجزء الملون من اللهب تفقد جزء من طاقتها بشكل ضوء له طول موجة محددة بعودة الذرات إلى حالتها الأساسية "ground state".

يُعطي النظام الكيميائي المناعي Immunochemistry System فرصة لتطبيق تكنولوجيا كشف سريعة عالية الأداء، لإنجاز اختبارات دقيقة للبروتينات النوعية والأدوية العلاجية. وهو يوفر إمكانيات تطبيقية عالية الكفاءة للعمليات التي تُجرى داخل المختبر السريري.

ولقد صُممت الأجهزة الحديثة التي تنجز عدد من الوظائف في وقت واحد، في كل خمس ثواني من النظام المعتمد للقياس بما فيها المعايرة، تقديم العينة للتحليل، بأخذ العينة والكاشف reagent وغسل المحفد cuvette.

## قياس الكدر Nephlometry




وهي طريقة متبعة في علم المناعة لتعيين مستويات IgM, IgG, and IgA. وهي تُنجز بتسليط ضوء مشع على العينة، ومن ثم قياس كمية الضوء المنعكس.

تُستخدم هذه الطريقة بشكل واسع في المختبرات السريرية، لأنها سهلة الأتمتة نسبياً. وهي تعتمد مبدأ أن الجزيئات الصغيرة في معلق ممدد ستبعثر الضوء المار بها، وتُعين كمية التبعثر بتجميع الضوء بزاوية محددة (عادة 70 أو 75 درجة).

يجري مزج ضد مستضد بتراكيز تسمح بتحوصب بسيط لا يصل إلى تجمع في الأسفل، ومن ثم تُقاس كمية الضوء المتبعثر وتُقارن مع كمية التبعثر من أمزجة معلومة. وتُعين الكمية المجهولة بواسطة منحنى معياري.

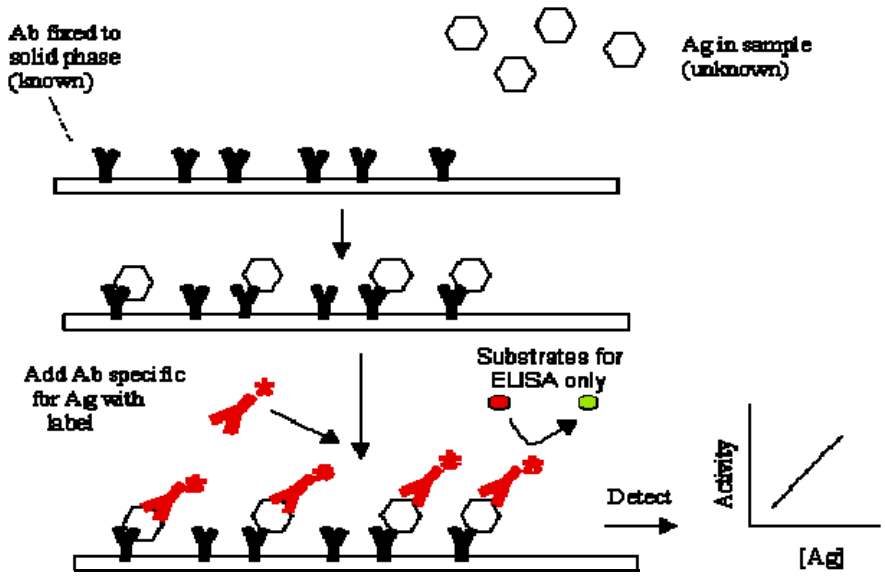
## المقايسات المناعية وطرق مسبار الحمض النووي

## Immunoassays and Nucleic Acid Probe Techniques

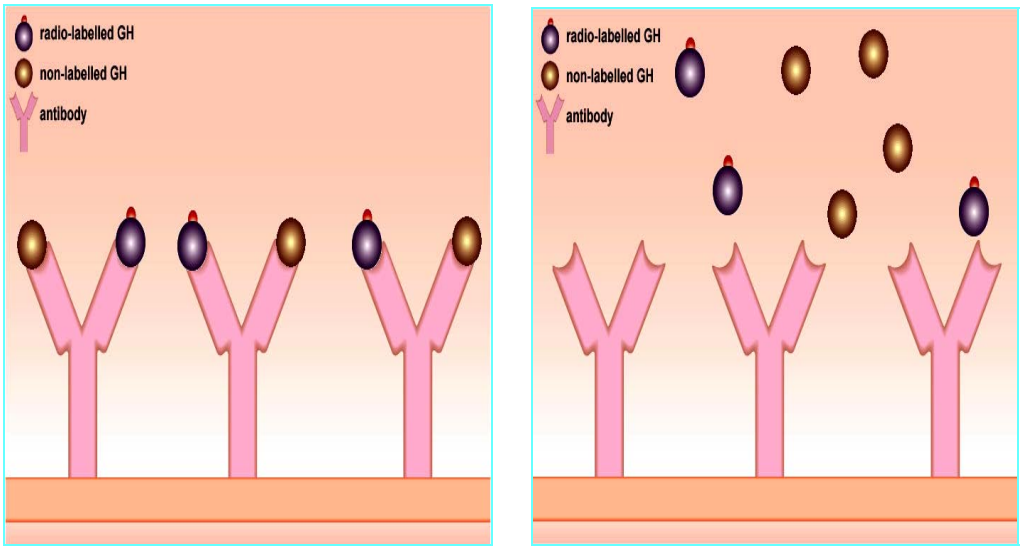
- **المقايسات المناعية Immunoassays**

في المقايسة المناعية يتعرف جزيء الضد antibody على المستضد antigen ويرتبط معه. والجزيء موضع الاهتمام يمكن أن يكون إما ضد وإما مستضد.

- **المقايسات المناعية غير الموسومة Unlabeled Immunoassays**
  - الترسيب المناعي في الهلام Immune Precipitation in Gel
  - كشف معقدات ضد–مستضد الطور السائل Detection of Fluid-Phase Antigen-Antibody Complex (قياس العكر Turbidimetry، قياس الكدر Nephelometry)
- **المقايسات المناعية الموسومة Labeled Immunoassays**
  - الوسائم الفعالة شعاعياً Radioactive Labels ($^{3}H$ , $^{125}I$)
  - الوسائم الإنزيمية Enzyme Labels
  - الوسائم المتألقة Fluorescent Labels




المقايسة المناعية الإنزيمية




المقايسات المناعية التنافسية Competitive Immunoassays

- **مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA)**

Enzyme-linked immunosorbent assay, Name suggests three components:

- Antibody الضد: Allows for specific detection of analyte of interest
- Solid phase (sorbent) (الممتز) الطور الصلب: Allows one to wash away all the material that is not specifically captured
- Enzymatic amplification التضخيم الإنزيمي: Allows you to turn a little capture into a visible color change that can be quantified using an absorbance plate reader

- **استخدامات الـ ELISA**

- قياس مستويات الأضداد (حالات التحسس allergies واللقاحات vaccines)؛
- كشف الفيروسات (التهاب الكبد hepatitis، عوز المناعة HIV، الأمراض التناسلية venereal diseases)؛
- كشف التبدلات الهرمونية (الحمل pregnancy)؛
- كشف الواصمات الالتهابية الجائلة (السيتوكينات cytokines).

- **محاسن Advantagesالـ ELISA**

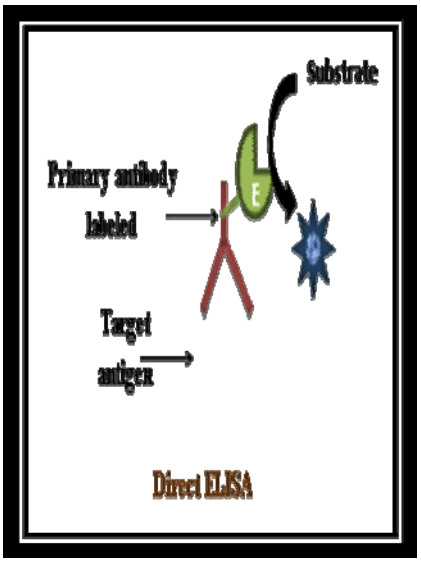
Sensitivity، Quantitative، Reproducible، Kit format.

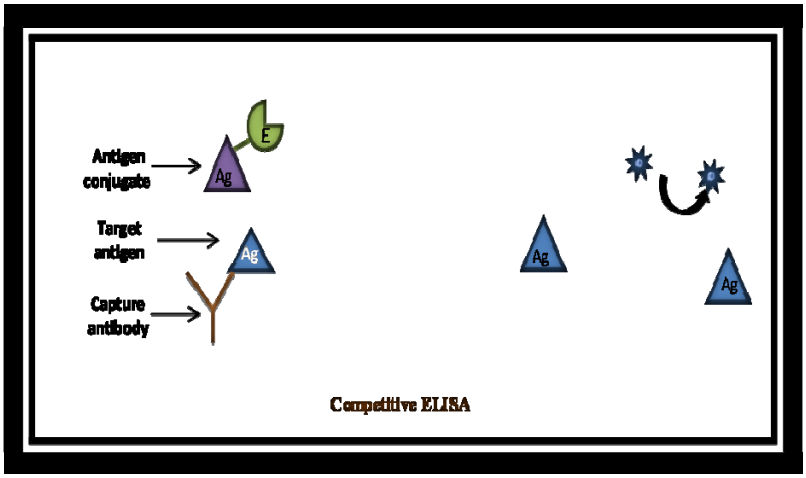
**Relative sensitivities of tests (approx)**

| | Usual operating range [Ab] or [Ag] |
|---|---|
| precipitation<br>immunoelectrophoresis<br>double/radial diffusion | 10 µg/ml - 1 mg/ml |
| immunofluorescence | 0.1 - 10 µg/ml |
| ELISA (colour) | 0.1 - 10 ng/ml |
| (chemiluminescence) | 0.01 - 10 ng/ml |
| radioimmunoassay | 0.01 - 10 ng/ml |

- **متطلبات اختبار الـ ELISA**

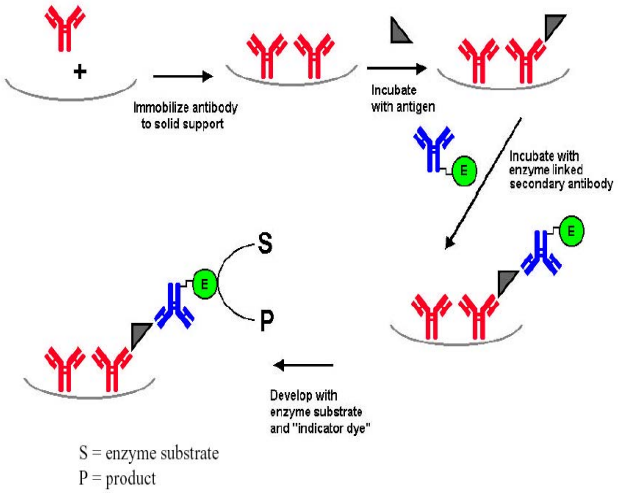
- مستضد منقى (إذا أردت كشف أو تحديد كمية ضد).
- ضد منقى (إذا أردت كشف أو تحديد كمية مستضد).
- محاليل معيارية ( شواهد سلبية أو إيجابية).
- عينة الاختبار.
- صفائح صغرية العيار: علب بلاستيكية مع حجرات صغيرة تُجرى فيها المقايسة.
- سائل شطف (دارئة).
- ضد مُعَلم بالإنزيم وركازة الإنزيم.
- قارىء ELISA (مقياس طيف ضوئي spectrophotometer) للقياسات الكمية.

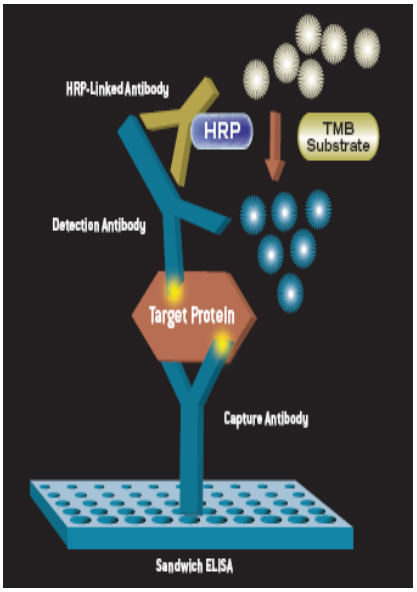


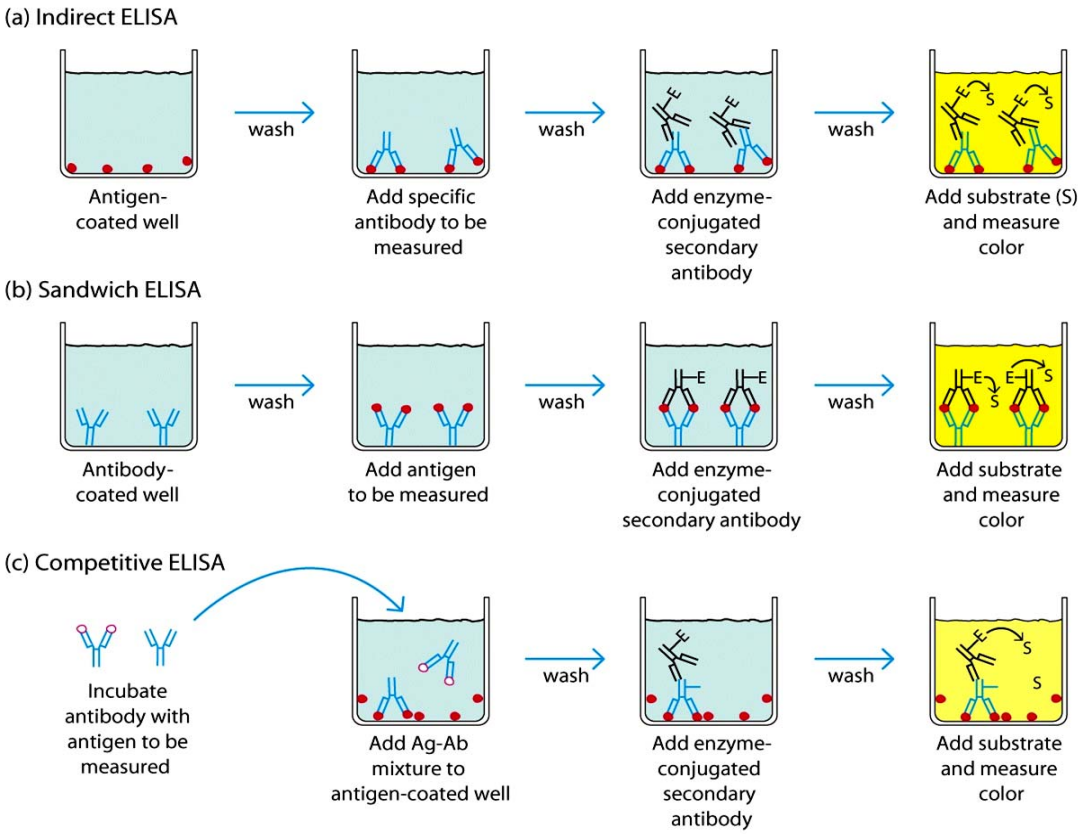



## Sandwich ELISA

تُغلل صفيحة الـ ELISA بالضد لكشف المستضد النوعي.

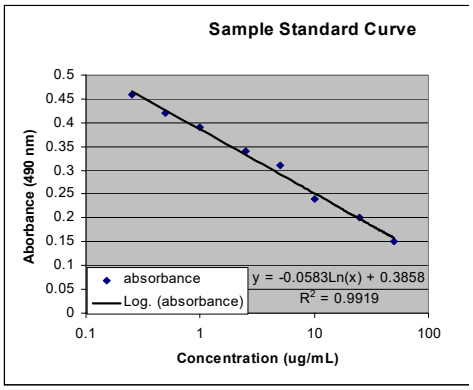


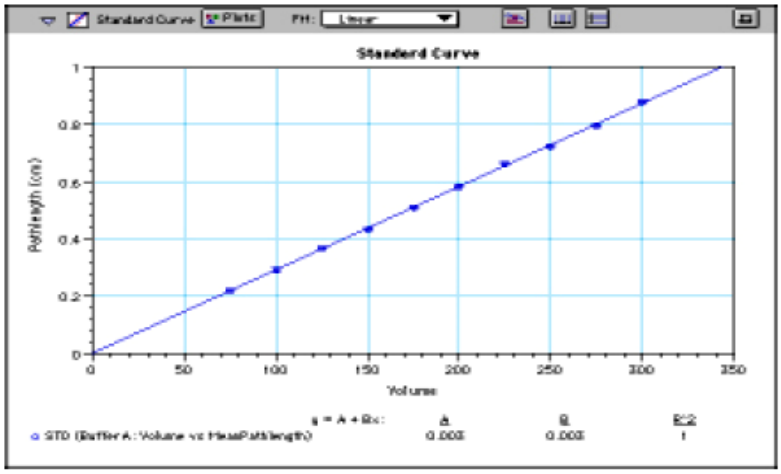



## Data Analysis تحليل المعطيات

- **Standard Curve in Excel**
  - Insert chart
  - Insert trend line (logarithmic)
- **T-test**
  - Ttest (array1, array2, tails, type)




The standards concentrations is specified on the x-axis and the reading of each standard is specified on the y-axis and the standard curve is drawn.




The calibration curve relating well volume to pathlength

- **يُعين تركيز عينة مراقبة الجودة من المنحنى المعياري وإذا كانت النتيجة في المجال المُعطى في العتيدة Kit المصنعة فإن النتيجة تكون مقبولة.**

This standard curve is used to determine the unknown concentration of each sample by finding the opposite concentration to the absorbance.