3- تم تخفيف عينات المصل فقط بتركيز 1/40 و ذلك بإضافة 5 مايكروليتر من العينة إلى (200) مايكروليتر من محول تخفيف النماذج Diluent solution و مزج جيدا .

4- أضيف (100) مايكروليتر من عينات السيطرة في الحفر المخصصة لها و أضيف (100) مايكروليتر من عينات المصل المخففة إلى الحفر المتبقية مع مراعاة عدم وجود الفقاعات الهوائية و مزجت جيدا ووضع لاصق خاص على الطبق لمنع التبخر و حُضنت بدرجة حرارة الغرفة لمدة (10) دقائق.

5- بعد انتهاء مدة الحضن غسلت الحفر (3) مرات بمحلول الغسل المخفف باستعمال جهاز الغسل(Bioelisa Washer ELx50,Biokit ,Spain) الملحق (2).

6- بعد إكمال عملية الغسل أضيفت قطرتين من كاشف الإنزيم المقترن Enzyme conjugate reagent لكل حفرة مع التحريك ثم وضع لاصق خاص على الطبق لمنع التبخر و حُضنت بدرجة حرارة الغرفة لمدة (10) دقائق .

7- غسلت الحفر (3) مرات بمحلول الغسل المخفف .

8- بعد إكمال عملية الغسل أضيف قطرتان من كاشف الصبغة Chromogen لكل حفرة و تم الحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة (5) دقائق .

9- عند انتهاء مدة الحضن أضيفت قطرتين من محلول إيقاف التفاعل Stop solution لكل حفرة و مزجت جيداً ، ملحق (3).

10- قرأت النتائج بعدما تم تصفير جهاز القراءة (Bioelisa reader EL x800 Biokit ,Spain) على الطول الموجي 450nm ، ملحق (2) .

3-2-2-3الحسابات Calculation

- تم حساب النتائج بالاعتماد على قراءة الامتصاص ، وتم مقارنتها بعينات السيطرة السالبة والموجبة ،وكما جاء بتعليمات الشركة المصنعة (DIAGNOSTIC Automation , Inc , USA)
- القراءة الموجبة / قراءة الامتصاص تكون أعلى أو مساوية لـ(0.2 OD)
- القراءة السالبة / قراءة الامتصاص تكون أقل من (0.2 OD)

3 -3 فحوصات الدم Hematological tests

1-3-3 الطرائق اليدوية : Manual Method

تم إجراء فحوصات الدم باستعمال الطرائق اليدوية ابتداء من 2009/9/1 ولغاية 2010/1/18 بعدها بدأنا بإجراء فحوصات الدم باستعمال جهاز (Sysmex KX-12N , Japan) الموضح في ملحق (4) .

1-1-3-3 قياس حجم الخلايا المرصوص Packed Cells Volume

1-1-1-3-3 المواد والمحاليل المستعملة :

1- الأنابيب الشعرية Capillary tubes الحاوية على مانع التخثر (الهيبارين) .

2- جهاز الطرد المركزي Micro centrifuge reader

2-1-1-3-3 طريقة العمل :

استعملت طريقة Dacie & Lewis(1995) إذ تم سحب الدم بواسطة الأنبوبة الشعرية مع ترك مسافة من الأنبوبة خالية ، ثم أغلقت أحدى نهايتي الأنبوبة بواسطة الطين الاصطناعي ، ووضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة خمس دقائق بسرعة (1000 دورة / دقيقة) وقرأت النسبة المئوية لخلايا الدم الحمر بواسطة مسطرة خاصة مرفقة مع جهاز الطرد المركزي .

3-3-1-2 تقدير مستوى خضاب الدم Hemoglobin concentration

تم استعمال جهاز قياس خضاب الدم الرقمي Digital Hb meter ومحلول درابكن Drabkin solution والمحضر من اذابة 1غم من بيكاربونات الصوديوم مع 0.05 غم من سيانيد البوتاسيوم الحديدي في 1000 مل من الماء المقطر بحسب طريقة Dacie & Lewis(1995).

3-3-1-2-1 طريقة العمل :

تضمنت طريقة العمل الخطوات الآتية :-

1. تحضير أنبوبتين اختبار .
2. يوضع في كل أنبوبة 5 مل من محلول درابكن .
3. يوضع 0.02 مل من الدم بواسطة ماصة أوتوماتيكية Micropipette إلى إحدى الأنبوبتين وتترك الأخرى للسيطرة .
4. تقاس الامتصاصية بعد 10 دقائق باستخدام المطياف الضوئي وبطول موجي 546 نانوميتر.

3-3-1-3 العد الكلي لخلايا الدم البيض Total count of leucocytes

3-3-1-3-1 المواد والمحاليل المستعملة

تم استعمال جهاز عداد خلايا الدم Haematocytometer الذي يتكون من شريحة زجاجية تعرف بشريحة Neubautrs chamber ، ومحلول التخفيف الذي يسمى Turk's solution الذي يقوم بتحطيم كريات الدم الحمر ويتكون من (2) مل من حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid و (98) مل من الماء المقطر مضافاً إليها قطرة واحدة من كاشف ازرق المثيلين Methylen blue كدليل لوني (سود ، 1992).

2-3-1-3-3 طريقة العمل :

تم سحب (0.4) مل محلول التخفيف ووضع في أنبوبة اختبار ثم أضيف إليها (0.02) مل من الدم المسحوب وتم رج المزيج جيداً ، وبعد ذلك التخلص من القطرات الأولى ثم وضعت قطرة على الشريحة وغطيت بواسطة غطاء الشريحة وتركت لمدة دقيقتين لكي تستقر ، بعدها فحصت بواسطة المجهر تحت قوة التكبير (10X) وتم عدّ خلايا الدم البيض في المربعات الكبيرة للشريحة واستخرج عدد الخلايا في المليمتر المكعب الواحد بتطبيق المعادلة الآتية :

عدد الخلايا في ملم^3 = عدد الخلايا المحسوبة X معامل التخفيف 50

2-3-3 الفحوصات الدموية باستعمال جهاز(Sysmex KX-12N)

أجريت فحوصات ومعايير الدم باستعمال هذا الجهاز بتاريخ 18 / 1 / 2010 ويعتمد مبدأ عمل الجهاز على العد الخلوي لخلايا الدم اوتوماتيكياً Automatic multi – parameter blood cell counter باستعمال أطوار موجية متعددة ، إذ تختلف أحجام وأقطار خلايا الدم وقابليتها على تنفيذ الضوء ، يستطيع هذا الجهاز أجراء أكثر من (60) فحص خلال الساعة الواحدة ويعرض النتائج على شاشة من ضمن الجهاز LCD ، ثم تطبع على ورقة صغيرة ،ويمكن تلخيص طريقة العمل بالتالي :

1- يتم إيصال التيار الكهربائي للجهاز بجهاز UBS .
2- نضغط على نقطة On في الجهة الجانبية للجهاز .
3- بعد تشغيل الجهاز تظهر على الشاشة بداية Calibration خاصة بالجهاز تستغرق وقتاً من (7-10) دقائق ، ويجب مراعاة عدم لمس الجهاز خلال هذه المدة .

4- يوضع الدم المراد فحصه بمقدار(20-30) مايكروليتر تحت إبرة سحب الدم الخاصة بالجهاز ، بعدها نضغط على زر البداية Start button فيبدأ عندها الجهاز بسحب كمية من الدم ، ثم يبدأ بتحليلها .

5- تقرأ النتائج من قبل الجهاز وتظهر مطبوعة أوتوماتيكياً فيظهر فيها نسبة حجم الخلايا المرصوص وتعداد كريات الدم البيض وكمية خضاب الدم .

4-3 اختبار مجاميع الدم Blood Group Test

اخذت 120 عينة دم من مجموع العينات المسحوبة من الأطفال وتم إجراء فحص مجاميع الدم لهم و ذلك بأخذ قطرات من الدم ووضعت على شريحة زجاجية (BERO-SLIDES, Germany) نظيفة ثم أضيفت ثلاث قطرات من المضادات لمجاميع الدم (Anti-ABO) المجهزة من (Spinreact, Spain) و سجلت النتائج بعد ملاحظة حدوث عملية التلازن Agglutination.

5-3 قياس الحساسية والخصوصية Determination of Sensitivity & Specificity

نظرا لأهمية قياس حساسية الاختبارات وخصوصيتها تم إجراء الحسابات الخاصة بذلك وكما يأتي :

الحساسية Sensitivity

هي احتمالية أن يكون الفحص موجب Positive عندما تكون الإصابة موجودة .

الخصوصية Specificity

هي احتمالية أن يكون الفحص سالبا Negative عندما تكون الإصابة غير موجودة.

ويمكن حساب الحساسية والخصوصية كما يلي

$$\text{الحساسية} = \frac{\text{عدد الحالات الموجبة الحقيقة(TP)}}{\text{عدد الحالات الموجبة الحقيقة(TP) + عدد الحالات السالبة الكاذبة (FN)}} \times 100$$

$$\text{الخصوصية} = \frac{\text{عدد الحالات السالبة الحقيقة(TN)}}{\text{عدد الحالات السالبة الحقيقة(TN) + عدد الحالات الموجبة الكاذبة (FP)}} \times 100$$

إذ إن :

TP=True positive

TN= True negative

FP= False positive

FN= False negative

(Schalling *et al*., 2002 ; Meredith *et al*., 1995)

ثانيا : الدراسة الوبائية

تم دراسة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي في محافظة الديوانية للمدة من 2009/9/1 إلى 2010 /8/31 ولغرض التعرف إلى انتشار الإصابة وتوزيعها في مركز المحافظة وبعض الاقضية والنواحي التابعة لها تم الاعتماد على الاستمارة المبينة أدناه التي تضمنت مجموعة من المعلومات مثل(الاسم ، الجنس ، العمر ، منطقة السكن ، تاريخ المراجعة ، الأعراض السريرية ....)

اسم المريض الثلاثي :-　　العمر :-

الجنس :-　　تاريخ المراجعة :-

العنوان

القضاء /　　الناحية /

القرية /　　اقرب نقطة دالة /

الأعراض المرضية

1. حمى (　　)　　مدة الحمى (　　) اسبوع
2. تضخم الطحال　　تضخم الكبد
3. فقر الدم
4. أعراض أخرى تذكر

المحور الوقائي

1. وجود الحرمس في دار المصاب .
2. وجود القوارض في دار المصاب.
3. وجود الكلاب السائبة في المنطقة .
4. هل تمت المكافحة ورش دار المصاب والدور المجاورة .
5. هل توجد حقول دواجن قريبة .

النتيجة

موجبة　　سالبة

شكل (3-1) أستمارة الاستبانة

شملت الدراسة الوبائية الجوانب الآتية:-

1- دراسة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي خلال أشهر الدراسة اعتبارا من 2009/9/1 ولغاية 31 / 2010/8 .

2- دراسة العلاقة بين مناطق السكن (أقضية ونواحي) والإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي لدى المراجعين إلى المستشفى ، وكذلك دراسة العلاقة بين الإصابة وطبيعة السكن (ريف ، مدينة) للأطفال المراجعين إذ تم وضع الأطفال الساكنين في القرى والأرياف في مجموعة الريف والساكنين في مناطق حضرية في مجموعة المدينة .

3- دراسة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي للمراجعين إلى المستشفى بحسب الجنس (ذكور ، إناث).

4- تم تقسيم الأطفال المراجعين إلى المستشفى إلى أربع فئات عمرية (اقل من سنة ، 1-3 سنوات ، 3- 5 سنوات و5-7 سنين) لغرض دراسة العلاقة بين الإصابة بالطفيلي وأعمار المراجعين .

6-3 التحليل الإحصائي : Statical Analysis

تم استعمال جدول تحليل التباين ANOVA Table باستعمال اقل فرق معنوي L.S.D. واختبار T- test والنسبة المئوية Percentage of infection في الدراسة الحالية لإيجاد الفروق المعنوية بين الإصابة والفئات العمرية والجنس والسكن وفصائل الدم وكذلك علاقة الإصابة ببعض معايير الدم وعند مستوى احتمالية ($P<0.05$) (الراوي ، 2000) .

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

4- النتائج Results

4-1 الدراسة التشخيصية

خلال المدة من 1 / 9 / 2009 ولغاية 31 / 8 / 2010 أجري الفحص المختبري على (215) عينة دم من الأطفال المراجعين لمستشفى النسائية والأطفال التعليمي في محافظة الديوانية باستعمال طريقتين للتشخيص هما فحص الشريط المناعي Immunochromatography test (Dipstick) وفحص الأمتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم Enzyme linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ، ويبين الجدول (2) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للإصابة بحسب نوع الفحص .

جدول (2) أعداد العينات المفحوصة الموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الأحشائي بحسب نوع الفحص

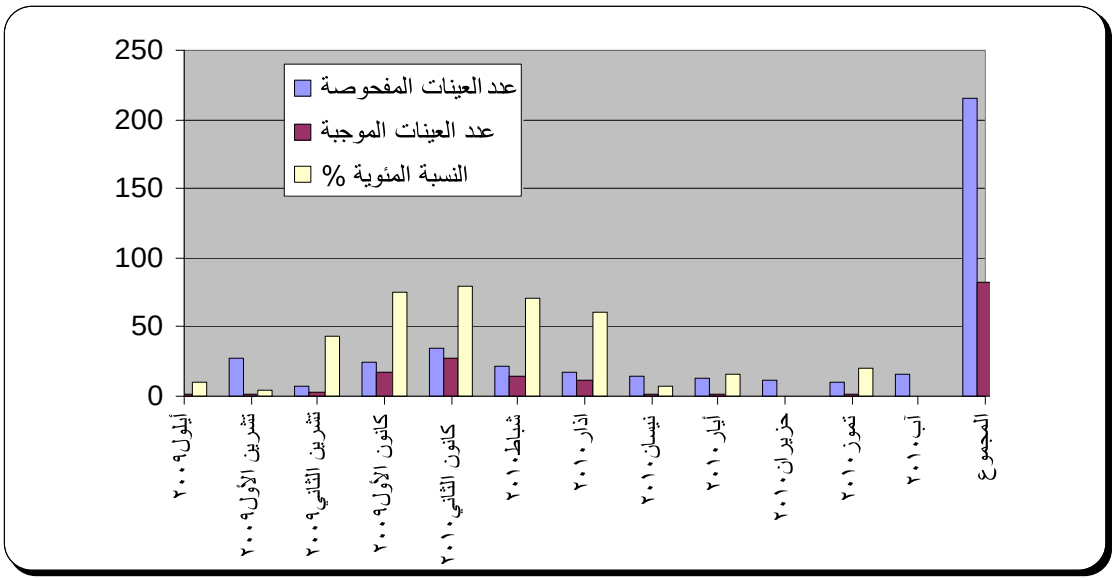
نوع الاختبار	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية %
Immunochromatography	215	83	38.60
ELISA	215	85	39.53

4- 2 الدراسة الوبائية

4-2-1 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الأحشائي موزعة بحسب أشهر الدراسة باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

يوضح الشكل (4-1) توزيع الإصابة بمرض اللشمانية الأحشائي بحسب المدة الزمنية للدراسة ، إذ سجلت ذروة الإصابة في شهر كانون الثاني وبنسبة (80%) يليه شهر كانون الأول وشباط بنسب (75 ، 71.43)% على التوالي ، ثم بدأت بالتناقص في الأشهر اللاحقة إلى أن انعدمت نهائيا في شهري حزيران وآب .

شكل (4-1) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الأحشائي بحسب أشهر الدراسة باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

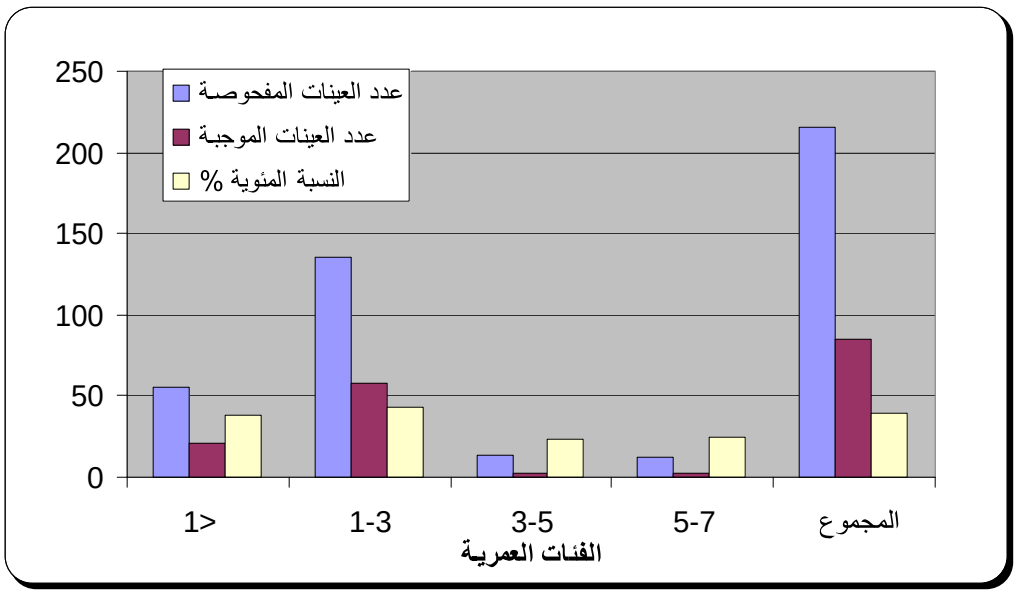


❖ قيمة L.S.D = 7.11

2-2-4 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الأحشائي موزعة بحسب الفئات العمرية باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

بينت نتائج الدراسة الحالية وجود فروق معنوية (P<0.05) بين الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي وأعمار الأطفال المراجعين ، إذ بلغت أعلى نسبة للإصابة (41.48%) عند الفئة العمرية (1-3) سنة وأقل نسبة للإصابة (23.07%) عند الفئة العمرية (3-5) سنة وكما هو موضح في الشكل (4-2).

شكل (4-2) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب الفئات العمرية باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)



❖ قيمة L.S.D = 2.02

3-2-4 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب الفئات العمرية والجنس باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

أظهرت النتائج وجود فروق معنوية (P<0.05) بين الذكور المصابين بمرض اللشمانية الاحشائي والفئات العمرية ، إذ سجلت أعلى نسبة للإصابة للذكور عند الفئة العمرية (1-3) سنة والتي بلغت (39.39%) ، كذلك أظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين الإناث المصابات بمرض اللشمانية الاحشائي في كل

الفئات العمرية وبلغت أعلى نسبة للإصابة عند الإناث في الفئة العمرية (أقل من سنة) التي بلغت (50%).وكما هو موضح في الجدول (3).

جدول (3) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب الفئات العمرية والجنس باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

الفئات العمرية/سنة	الجنس					
	ذكور			إناث		
	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية (%)
1>	31	9	29.03	24	12	50
3 – 1	66	26	39.39	69	30	43.47
5 – 3	6	1	16.66	7	2	28.57
7- 5	5	0	0	7	3	42.85
المجموع	108	36	33.33	107	47	43.92

- ❖ الذكور L.S.D = 5.89
- ❖ الإناث L.S.D. = 1.11

4-2-4 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الأحشائية موزعة بحسب طبيعة السكن باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

بينت النتائج وجود فروق معنوية ($P<0.05$) في نسبة الإصابة بين مناطق الريف والمدينة ، إذ سجلت (74) إصابة في مناطق الريف وبنسبة (41.43%) بينما سجلت (9) إصابات في مناطق المدينة وبنسبة (25%) وكما هو موضح في الجدول (4).

جدول (4) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب طبيعة السكن (ريف ، مدينة) باستعمال فحص (Dipstick)

مناطق السكن	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية %
الريف	179	74	41.34
المدينة	36	9	25
المجموع	215	83	38.60

5-2-4 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي موزعة حسب طبيعة السكن والجنس باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

يبين الجدول (5) توزيع حالات الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي للذكور والإناث بحسب طبيعة السكن (الريف والمدينة) ، ولقد أظهرت نتائج التحليل الإحصائي فروقاً معنوية ($P<0.05$) ، إذ بلغت نسبة الذكور المصابين الساكنين في الريف (35.22 %) ، ونسبة الإناث المصابات الساكنات في الريف (47.25%) ، بينما كانت نسب الذكور والإناث الساكنين في المدينة المصابين بمرض اللشمانية الاحشائي (25%) لكل منهم .

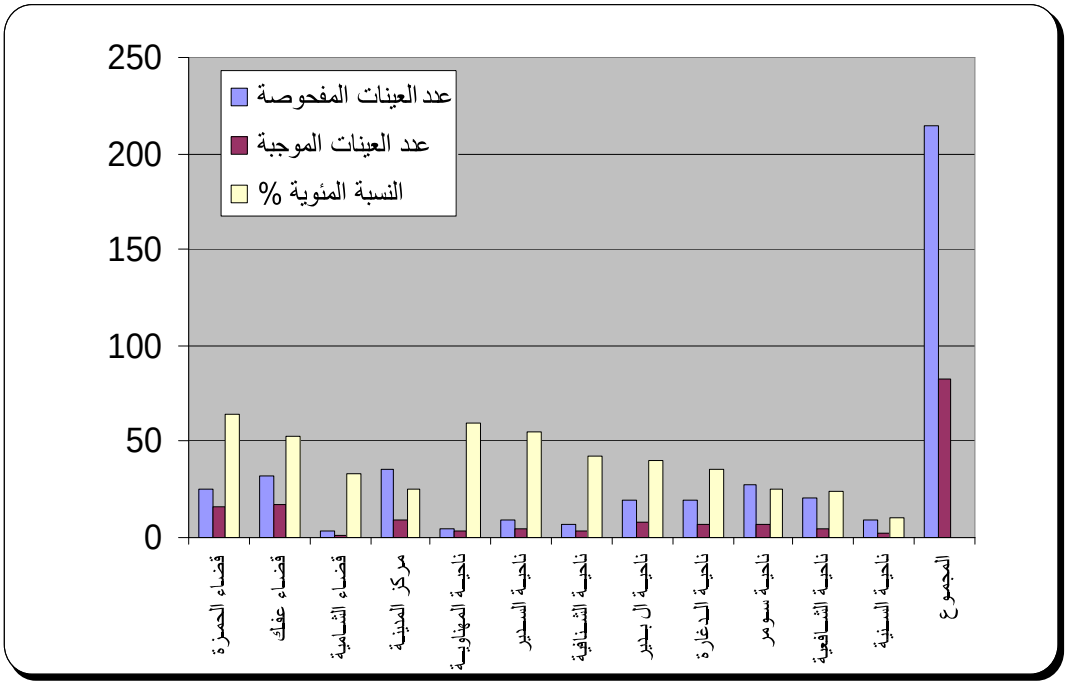
جدول (5) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب طبيعة السكن والجنس باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

طبيعة السكن	الجنس					
	ذكور			إناث		
	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية	عدد العينات المفحوصة	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية
ريف	88	31	35.22	91	43	47.25
مدينة	20	5	25	16	4	25
المجموع	108	36	33.33	107	47	43.92

6-2-4 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب مناطق السكن باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

يبين الشكل (4-3) توزيع حالات الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي بحسب أقضية محافظة الديوانية ونواحيها ، إذ أظهرت النتائج وجـــــــود فروقاً معنوية ($P<0.05$) ، إذ سجلت أعلى نسبة للإصابة في قضاء الحمزة (64%) وأقل نسبة كانت في ناحية السنية (10.53%) .

شكل (4-3) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب مناطق السكن (أقضية ونواحي) باستخدام فحص الشريط المناعي (Dipstick)



❖ قيمة L.S.D. = 9.83

4-2-7 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب مناطق الدراسة والجنس باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

أظهرت نتائج الدراسة الحالية اختلافات غير معنوية بين الذكور والإناث المصابين بمرض اللشمانية الاحشائي وبين مناطق سكنهم وكما هو موضح في الجدول (6).

جدول (6) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب مناطق السكن والجنس باستعمال فحص الشريط المناعي (Dipstick)

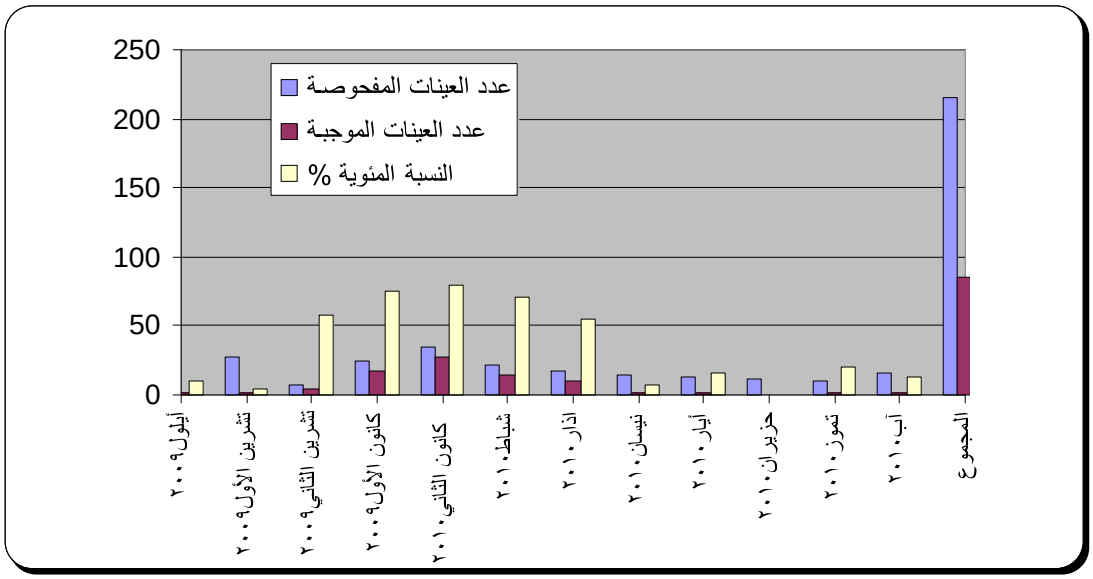
مناطق السكن	الجنس					
	ذكور			إناث		
	المفحوص	عدد الموجب	النسبة المئوية	المفحوص	عدد الموجب	النسبة المئوية
مركز المدينة	20	5	25	16	4	25
قضاء الشامية	3	1	33.33	0	0	0
قضاء الحمزة	12	8	66.66	13	8	61.53
قضاء عفك	16	5	31.25	16	12	75
ناحية الدغارة	8	4	50	12	3	25
ناحية سومر	14	2	14.28	14	5	35.71
ناحية الشافعية	9	1	11.11	12	4	33.33
ناحية السدير	4	1	25	5	4	80
ناحية السنية	6	2	33.33	3	0	0
ناحية ال بدير	9	5	55.55	11	3	27.27
ناحية المهناوية	3	1	33.33	2	2	100
ناحية الشنافية	4	1	25	3	2	66.66
المجموع	108	36	33.33	107	47	43.92

- الذكور L.S.D.= 18.2
- الإناث L.S.D. = 22.15

4-2- 8 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب أشهر الدراسة باستعمال فحص ELISA

أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي وأشهر السنة ، إذ سجلت قمة الإصابة في شهري كانون الثاني وكانون الأول ، وبنسب (80 ، 75 %) على التوالي ، بعدها بدأت بالانخفاض خلال الأشهر اللاحقة ثم اختفت الإصابة نهائياً في شهر حزيران ،وكما هو مبين في الشكل (4-4).

شكل (4- 4) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية لمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب أشهر الدراسة باستعمال فحص الامتزاز المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA

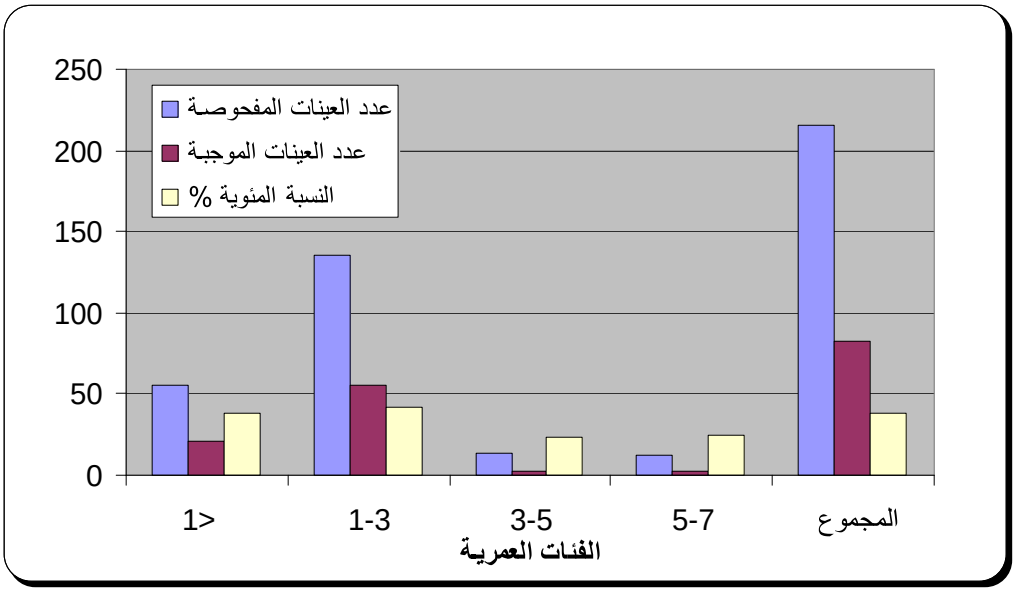


❖ قيمة L.S.D. = 6.20

9-2-4 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب الفئات العمرية باستعمال فحص ELISA

يبين الشكل (4-5) العلاقة بين الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي والفئات العمرية ، إذ أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($P<0.05$) ، فقد سجلت أعلى نسبة للإصابة (42.96%) في الفئة العمرية (1-3) سنة ، وأقل نسبة للإصابة (23.07%) عند الفئة العمرية (3-5) سنة .

شكل (4-5) أعداد العينات المفحوصة والموجبة والنسب المئوية للحالات الموجبة لمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب الفئات العمرية باستعمال فحص الامتزاز المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA



❖ قيمة L.S.D. = 2.23

10-2-4 نسبة الإصابة بمرض اللشمانية الاحشائي موزعة بحسب الفئات العمرية والجنس باستعمال فحص ELISA

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاً معنوية ($P<0.05$) بين الذكور المصابين بمرض اللشمانية الاحشائي والفئات العمرية ، إذ سجلت أعلى نسبة للإصابة (42.42 %) في الفئة العمرية (1-3) سنة ، ولم يتم تسجيل إصابة عند الذكور في الفئة العمرية (5-7) سنة ، بينما اختلفت نتائج الإناث المصابات