علم السموم الشرعي
Forensic Toxicology
القسم العملي

مقدمة :

يتطلب الأمر في بعض الاحيان في الطب الشرعي الكشف عن السموم المختلفة في العينات الحيوية و غير الحيوية بالاضافة الى تحديد كمية المادة السامة اي تفاعلات كيفية و كمية لذلك يجب على الخبير في التحاليل السمية ان يعطي نتائج دقيقة عن التحاليل التي يجريها من اجل خدمة العدالة .

كما يتطلب الامر في بعض الاحيان الكشف عن البقع الدموية أو السائل المنوي في مسرح الجريمة , و هذا يتطلب معرفة مجموعة من الامور في علم السموم التحليلي و الشرعي و منها :

1 – الأجهزة و الادوات و الكواشف

2 – المظاهر السريرية للتسممات المختلفة

3 – الموجودات المخبرية في التسممات

4 – المظاهر العملية لعلم السموم التحليلي

5 – الاختبارات الكيفية للسموم

6 – الاختبارات الكمية للسموم

1 – الاجهزة :

يتطلب المخبر نفس الاجهزة و الادوات الموجودة في مخابر الكيمياء الحيوية السريرية بالاضافة الى بعض الاجهزة الخاصة و اهمها :

- صفائح تفريق لوني Thin-layer Chromatography
- جهاز الانتشار الدقيق Microdiffusion (حجيرة كونوي Conway)
- جهاز كريبيير لكشف و معايرة الزرنيخ

بالاجهزة السابقة يمكن ان يتم العمل و لكن لا بد من وجود أجهزة دقيقة و متطورة تنجز العمل بسهولة و دقة مثل :

- Gas Chromatography (GC)
- HPLC
- Atomic Apsorption
- Immuno assys
- Ion Selective Electrodes (ISE)

Table 1. Summary of basic equipment required for toxicological analyses

Reliable, regularly serviced and calibrated laboratory balances (top-pan and analytical) (section 4.1.3.)
Bench-top centrifuge (electrical or hand-driven) for separating blood samples and solvent extracts (section 4.3.2)
Vortex-mixer or other form of mechanical or hand-driven shaker such as a rotary mixer (section 4.3.2)
Water-bath and (electrical) heating block
Spirit lamp or butane gas burner
Refrigerator (electrical or evaporative) for storing standards/samples
pH meter
Range of automatic and semi-automatic pipettes (section 4.1.3)
Low-power, polarizing microscope
An adequate supply of laboratory glassware, including volumetric apparatus, and adequate cleaning facilities (section 4.1.5)
A supply of chemically pure water (section 4.1.4)
A supply of compressed air or nitrogen
A supply of thin-layer chromatography plates or facilities for preparing such plates (section 4.4.1)
Facilities for developing and visualizing thin-layer chromatograms, including an ultraviolet lamp (254 nm and 366 nm) and a fume cupboard or hood (section 4.4.4)
Single-beam or dual-beam ultraviolet/visible spectrophotometer and associated cells (section 4.5.2)
Conway microdiffusion apparatus (section 4.3.3)
Porcelain spotting tile (section 4.2)
Modified Gutzeit apparatus (section 6.6)

2 – المظاهر السريرية :

عندما يحصل تسمم حاد لشخص ما فان الطبيب الشرعي أو عالم السموم يحتاج ان يسال عدد من الاسئلة لتقييم حالة المتسمم في حالة عدم الوفاة

وفي حالة الوفاة أو الغيبوبة تبدا عملية البحث حول الضحية عن اي مواد دوائية او عبوات فارغة او زجاجات (Scene residues)

و التي ان وجدت تكون هامة جدا .

الفحوص الفيزيائية للمصاب يمكن ان تحدد او توجه نحو السم او صنف المادة المتناولة

في بعض التسممات يظهر البول بالوان مختلفة

كما يمكن التوجه نحو بعض التسممات من رائحة محتويات المعدة أو القيء

جدول يبين الارتباط بين بعض الملامح السريرية و بعض المواد السامة الشائعة :

الملامح السريرية	المواد السامة
الجهاز العصبي المركزي الترنح Ataxia	البروميدات , ايتانول , كاربامازيبين , المنومات , المركنات , تاليوم فينيتوئين
السبات Coma	الكحول , المنومات , المهدئات , الافيونات .....
الاختلاج Convulsions	أدوية TCA , اورفينادرين , ثيوفيللين , ستريكنين ...
جهاز التنفس : خمود التنفس Respiratory depression	منومات و مركنات , كحولات , افيونات , مهدئات .....
وذمة رئوية Pulmoary oedema	الاسبيرين و شبيهاته , مبيدات الاعشاب من زمرة كلوروفينوكسي الغازات المخرشة , المحلات العضوية , الافيونات , باراكوات
اللهاث Hyperpnea	الصفصافات , ايتيلين غليكول , مبيدات الاعشاب من زمرة هيدروكسي بنزونتريل , ميتانول , ايزونيازيد , بنتاكلوروفينول
القلب و الدوران : تسرع القلب Tachycardia	مقلدات الودي , مضادات نظير الودي
بطء القلب Bradycardia	الافيونات , مقلدات نظير الودي , حاصرات بيتا
ارتفاع الضغط Hypertension	مقلدات الودي , مضادات نظير الودي
انخفاض الضغط Hypotension	ايتانول , منومات و مهدئات , الافيونات ...
اضطراب نظم القلب Arrhythmia	حاصرات بيتا , سيانيد , ديجوكسين , كلوروكين , فينوتيازين كينيدين , ثيوفيللين , ادوية TCA

العين : انقباض الحدقة Miosis	مبيدات الحشرات الفوسفورية العضوية و الكاربامات الافيونات , فينوتيازين , فينسيكليدين
توسع الحدقة Mydriasis	امفيتامينات , اتروبين و شبيهاته , كوكائين , أدوية TCA
رأراة Nystagmus	ايتانول , كاربامازيبين , فينيتوئين
حرارة الجسم : فرط الحرارة Hyperthermia	صفصافات , مبيدات الحشرات من زمرة دينتروفينول مبيدات الاعشاب من زمرة هيدروكسي بنزونتريل , بنتاكلوروفينول كينيدين , بروكائيناميد
انخفاض الحرارة Hypothermia	غاز CO , ايتانول , مهدئات و منومات , أفيونات , فينوتيازين أدوية TCA
جهاز الهضم : زيادة افراز اللعاب Hypersalivation	مضادات الكولين استراز , ستريكنين
جفاف الفم	اتروبين , أفيونات , فينوتيازين , أدوية TCA
الامساك Constipation	الافيونات , التاليوم , الرصاص
الاسهال Diarrhia	مضادات الكولين استراز , الزرنيخ , الملينات و المسهلات
نزف جهاز الهضم	صفصافات , المواد الكاوية , كومارينات , مضادات التخثر , أدوية NSAIDs
تاذي الكبد	سموم فطر الامانيت , كاديموم , رباعي كلور الكربون ايتيلين غليكول , زئبق , باراسيتامول

الجهاز البولي : احتباس البول Urinary retention	أتروبين , أفيونات , أدوية TCA
سلس البول Incontinence	مبيدات الحشرات الفوسفورية العضوية و الكاربامات
تاذي الكليتين	سموم فطر الامانيت , كاديموم , رباعي كلور الكربون ايتيلين غليكول , بروم , باراسيتامول , زئبق
الجلد و ملحقاته : العد (حب الشباب)	مبيدات الحشرات الكلورية العضوية , الديوكسينات , مركبات البيفينيل متعددة الكلور , البروميدات
فقدان الشعر	التاليوم

جدول يبين بعض الحالات التي يظهر فيها البول بألوان مختلفة :

لون البول	المادة السامة
بني او اسود	نتروبنزن , فينول , الراوند (بسبب فشل كبدي)
أصفر أو برتقالي	كاسكارا , فلوروسيئين , فينولفتاليئين , السنا , نتروفورانتوئين
أحمر خمري أو بني	الصبر , الفينوتيازين , فينيتوئين , كينين , وارفارين (بيلة دموية)
أزرق او اخضر	أدوية TCA , اميتريبتيلين , اندوميتاسين

جدول يبين الرائحة الوصفية لمحتويات المعدة لبعض السموم :

الرائحة	المادة السامة
رائحة اللوز المر	السيانيد , النتروبنزن
رائحة الفواكه	الكحولات بما فيها الايتانول , الاسترات
رائحة الثوم	الزرنيخ , الفوسفور
رائحة الكافور	الكافور
رائحة الاجاص	الكلورال
رائحة النفط	مشتقات البترول و يمكن تواجدها مع مبيدات الحشرات
رائحة الفينول	الفينولات , المعقمات و المطهرات
رائحة التبغ	نيكوتين
رائحة بوليش الاحذية	نتروبنزن
الحلو	الكلوروفورم , الهيدروكربونات الهالوجينية

3 – الموجودات المخبرية : General Laboratory Findings in Toxicology

العديد من الفحوص المخبرية يمكن ان تكون مفيدة في تشخيص التسممات الحادة و في تحديد الانذار و تقييم حالة المصاب , و **هذا جدول يبين اهم الفحوص المخبرية للدم و البول :**

سكر الدم	- ينخفض سكر الدم نتيجة زيادة جرعة الانسولين , او خافضات السكر الفموية التسمم الشديد باملاح الحديد , بعض الفطور , تتالي تناول الاسبيرين بكميات كبيرة , تناول الايتانول خاصة عند الاطفال و الكهول , الباراسيتامول في حالة الفشل الكبدي
كهارل و غازات الدم و PH	- الغيبوبة و السبات الذي ينتج عن جرعات عالية من المنومات و المهدئات أو الافيونات يتصف غالبا بنقص الاكسجة و احمضاض تنفسي - جرعة زائدة من الصفصافات تسبب مبدئيا فرط تهوية ة تقلون تنفسي و الذي يتطور الى حماض استقلابي و نقص بوتاسيوم المصل - ينقص بوتاسيوم المصل في التسمم بالتيوفيللين و السلبوتامول و التسمم الحاد بالباريوم - يزداد بوتاسيوم الدم في التسمم الحاد بالديجوكسين - شاردة HCO3 تتأثر في التسمم بالسيانيد و اول اوكسيد الكربون و الايتيلين غليكول و الميتانول و الفلورواسيتات و البارالدهيد و الصفصافات - التحمضن الاستقلابي السمي يحصل في التسمم الشديد بالحديد و الايتانول و الباراسيتامول و الايزونيازيد و الميتفورمين و التيوفيللين ملاحظة : توازن الكهارل في الجسم يعتمد على : حالة الاماهة , وضع الكليتين , التبدلات المرافقة في استقلاب الفوسفات و الكلوريد و الكالسيوم و الصوديوم و المغنزيوم
أنزيمات البلاسما	- الصدمة و السبات و الاختلاجات غالبا ما تكون مترافقة مع ازدياد غير نوعي في فعالية بعض الانزيمات المصلية مثل (LDH , GOT , GPT) و تقاس فعالية هذه الانزيمات لتقييم الضرر على الاعضاء المختلفة و عادة تزداد الفعالية بعد عدة ايام من التسمم و تعود ببطء الى وضعها الطبيعي (تزداد بسرعة بعد تناول جرعات سامة من المواد التي تسبب تخرب النسيج الكبدي مثل الباراسيتامول و رابع كلور الكربون و املاح النحاس و التي تحتاج الى عدة اسابيع حتى تعود الفعالية الى طبيعتها) - التسمم المزمن بالكحول الايتيلي يسبب دائما زيادة في فعالية غاماغلوتاميل ترانسفيراز - فعالية الكولين استراز تنقص في التسمم بمبيدات الفوسفور العضوية و الكاربامات

تخثر الدم	- زمن البروترومبين المطول هو غالبا مؤشر مبكر لتأذي الكبد في حالات التسمم بالمركبات التي تستقلب في الكبد مثل الباراسيتامول - زمن البروترومبين و القياسات الاخرى لتخثر الدم تكون غير طبيعية في حالات التسمم بمشتقات الكومارين المضادة للتخثر
ميتهيموغلوبين	- يتشكل بعد التعرض لجرعات كبيرة من المواد المؤكسدة مثل الكلورات و النتريت و التعرض للمركبات النترية و الامينية العطرية و يظهر الدم بلون الشوكولاتة , (و يجب ان يتم التحليل بسرعة لان الميتهيموغلوبين غير ثابت و نتيجة تحليل العينات المخزونة تكون غير دقيقة)
كاربوكسي هيموغلوبين	- يستخدم هذا الفحص في التسمم الحاد بغاز CO و التسمم المزمن بمركب دي كلورميتان
هيماتوكريت	- التعرض الحاد او تحت الحاد لجرعات عالية من املاح الحديد او الصفصافات أو الاندوميتاسين أو ادوية NSAIDs يمكن ان يسبب نزف هضمي يؤدي الى فقر دم - فقر الدم يمكن ان يحصل نتيجة التدخل في صنع الهيم مثل الرصاص - بعض المركبات تؤدي الى انحلال الدم مثل الزرنيخ بشكل مباشر - او انحلال دم غير مباشر بسبب نقص انزيم G6PD و الذي تسببه مركبات مثل الابريماكوين و الكلورامفينيكول و النتروفورانتوئين و غيرها
تعداد الكريات البيضاء	- يزداد العدد غالبا في التسممات الحادة كما في الاستجابة للتحمضن الاستقلابي الحاد الذي ينتج عن الايتيلين غليكول او الميتانول - او يحدث نتيجة التهاب الرئة الركودي الناتج عن سبات طويل
البول	اللون , الرائحة , البيلة الدموية , الكثافة النوعية , PH ....

4 – المظاهر العملية و خطوات العمل في التحريات التحليلية السمية :

قبل مرحلة التحليل :

- اخذ فكرة عن دخول السم متضمنة أي دلائل تفصيلية عن التسمم و النمتائج البيوكيميائية و الدموية
- أخذ فكرة عن قصة المصاب المرضية و الدوائية اذا امكن ذلك و التأكد من نجاح أخذ العينات المناسبة للتحليل و اقتراح الأفضلية للتحاليل

مرحلة التحليل :

- اجراء التحاليل الموافقة و المناسبة

مرحلة ما بعد التحليل :

- تفسير النتائج و مناقشتها مع الطبيب السريري المشرف على المصاب او مع الطبيب الشرعي
- اجراء تحاليل اضافية اذا وجدت عينات متبقية او أخذ عينات أخرى

امثلة عن تفسير التحاليل السمية الاسعافية و طرق المعالجة :

المادة السامة	التركيز في البلاسما المرتبط بسمية شديدة	المعالجة
با راسيتامول	200ملغ/ل حتى 4ساعات بعد تناول المادة 30 ملغ/ل حتى 15 ساعة بعد تناول المادة	أسيتيل سيستيئين او ميتيونين
ميتانول ايتيلين غليكول	0.5غ/ل 0.5غ/ل	ايتانول , ديال صفاقي أو ديال دموي
تاليوم	0.2 غ/ل	أزرق بروسيا بوتاسيوم هكسانوفرات
الحديد	5 ملغ/ل (مصل)	ديفيروكسامين
الرصاص	1 ملغ/ل (دم كامل عند الكهول)	EDTA BAL دي ميركابتوسوكسينيك اسيد DMSA
الكادميوم	20 مكغ/ل (دم كامل)	DMSA
الزئبق	100 مكغ/ل (دم كامل)	DMSA دي ميركابتوبروبان سلفونات DMPS

الزرنيخ	200 مكغ/ل (دم كامل)	DMPS
الصفصافات	900 ملغ/ل خلال 6 ساعات بعد تناول المادة 450 ملغ/ل خلال 24ساعة	ادرار قلوي , ديال صفلقي أو ديال دموي
فينوباربيتال	200 ملغ/ل	ادرار قلوي
مبيدات الاعشاب من زمرة كلوروفينوكسي	500 ملغ/ل	ادرار قلوي
ليثيوم	14 ملغ/ل	ديال صفاقي او ديال دموي
ايتانول	5 غ/ل	ديال صفاقي او ديال دموي

استقصاء السموم و الادوية

سنذكر في هذا البحث مباديء كشف و معايرة بعض المواد الدوائية و السامة في سوائل الجسم المختلفة , و لكن قبل البحث بطرق الكشف و المعايرة لا بد من اخذ بعض الملاحظات بعين الاعتبار :

- الاختلاف في درجة استقلاب العديد من السموم و الادوية بين الناس
- قد يتناول بعض الافراد أدوية مؤثرة على الحالة النفسية بجرعات كبيرة و بعضها محظور الاستعمال و يتطلب الامر كشف هذه المواد بطرق غالبا تكون كيفية .
- قد تحصل حالات تسمم حاد نتيجة تناول بعض الادوية بجرعات عالية بقصد جرامي او الانتحار , و يتطلب الامر في هذه الحالة معرفة الدواء او السم المستعمل و ذلك بتحريه في الدم او البول او الرشافة المعدية , و في حالة الوفاة في الاحشاء او الشعر أو أعضاء اخرى , و في اغلب الاحيان يكون التحليل كيفي و لا يتطلب التحديد الكمي للدواء , و اغلب المواد الدوائية السامة في هذه الحالات : (الباربيتةريات , المهدئات و المنومات مضادات الاكتئاب , الادوية التي تستعمل بكثرة مثل الاسبيرين و الباراسيتامول .....) .
- هناك تسممات تنتج عن بعض المهن و كذلك الملوثات البيئية
- التحاليل عند المدمنين على المخدرات , و التحاليل في حالة استخدام المنشطات عند الرياضيين

العينات المستخدمة لاجراء التحاليل :

البول :

يمتاز عن غيره من السوائل الحيوية :

- وفرته من الناحية الكمية
- يمكن التحري كيفيا او كميا عن المادة السامة او مستقلباتها
- امكانية كشف بعض الادوية و السموم أو مستقلباتها رغم اختفائها من الدم

و لكن من مساوئه :

- يوجد بعض المواد التي قد لاتفرغ
- او تؤدي الى اذية كلوية شديدة او احتباس البول

الدم :

- يؤخذ على مضاد تخثر غالبا
- معرفة التراكيز من المواد الدوائية او السامة تكون هامة غالبا في حالات المراقبة , و هي اقل ضرورة في حالات التسمم الشديد .
- قد تكون في بعض الاحيان معايرة بعض المواد السامة كميا او كيفيا في الدم اكثر صعوبة بسبب انتقالها من الدوران و تثبتها على النسج .
- كما ان كشف و معايرة السموم في الدم تتطلب اجراء عملية استخلاص للمواد السامة من الدم احيانا

الرشافة المعدية :

اذا امكن الحصول عليها خلال ساعة او ساعتين من تناول المادة السامة فانها تكون حاوية غالبا على تراكيز عالية نسبيا و باشكال غير معدلة كيميائيا ,

و قد تساعد بقايا المضغوطات او الروائح المميزة في تمييز الدواء احيانا

و يحتاج فصل هذه المواد عن باقي المكونات المعدية الى طرق استخلاص خاصة

الأحشاء :
الكبد , الطحال , جزء من المعدة و الامعاء , القلب , جزء من الرئتين ...
تؤخذ من الأشخاص المتوفين بحادثة تسمم من أجل كشف المادة السامة ان وجدت

الشعر و الأظافر :
تؤخذ للكشف عن بعض السموم و الادوية في الجياة أو بعد الموت

جدول يبين الفترة التقريبية لكشف السموم في العينات المختلفة :

المادة السامة	البول	الدم	الشعر
الكحول	3-5ايام يكشف عن ايتيل غلوكورونيك 11-12 ساعة يكشف عن بقايا الكحول	12 ساعة	طول العمر
الامفيتامينات عدا الميتامفيتامين	1-2 يوم	12 ساعة	حتى 90 يوم
الميتامفيتامين	2-4 يوم	24 ساعة	حتى 90 يوم
فينوباربيتال	4-7 ايام	4-7 ايام	حتى 90 يوم
الباربيتوريات الاخرى	2-3 يوم	1-2 يوم	حتى 90 يوم
بنزوديازيبينات	الاستعمال العلاجي 3 يوم الاستعمال الدائم لاكثر من سنة 4-6 اسبوع	6-48 ساعة	حتى 90 يوم
القنب الهندي (حشيش)	استعمال مرة واحدة 4 7 ايام استعمال طويل 3-4 اسابيع	12 يوم	حتى 120يوم
كوكائين	2-4 يوم	24 ساعة	حتى 90 يوم
كوديئين	1 يوم	12 ساعة	30 ساعة

مورفين	2 يوم	6 ساعة	حتى 90 يوم
هيروئين	2 يوم	6 ساعة	حتى 90 يوم
LSD	24-2 ساعة	3-0 ساعة	حتى 3 ايام
كوتينين (مستقلب النيكوتين)	4-2 يوم	4-2 يوم	حتى 90 يوم

تجهيز العينات للتحليل :

العديد من المواد السامة و الدوائية اذا وجدت بتراكيز كافية و بغياب مركبات متداخلة تعطي الوان وصفية مع كواشف مناسبة , و هذا ما سنناقشه في التحليل السمي السريع للبول .

المعالجة الاولية للعينات :

- حلمهة بعض المواد التي تكون مقترنة مع مع مركبات مثل السلفات او الغلوكورونيد في البول و ذلك عن طريق اضافة حمض و بالحرارة او اضافة بعض الانزيمات
- بعض العينات يحتاج الى ترسيب البروتينات مثل الدم
- بعض العينات يحتاج الى تخريب المركبات العضوية و خاصة من اجل الكشف و معايرة المعادن الثقيلة
- الاستخلاص بالمحاليل العضوية (سائل/ سائل) للادوية و السموم الاخرى

يفضل في الحالات التي لا يعرف فيها طبيعة الدواء او السم المتناول تحضير خلاصة مناسبة و تجزئتها حسب الصفات الكيميائية البسيطة (طرق الاستخلاص للمواد الدوائية الثابتة بواسطة المحلات العضوية في وسط حمضي و قلوي)

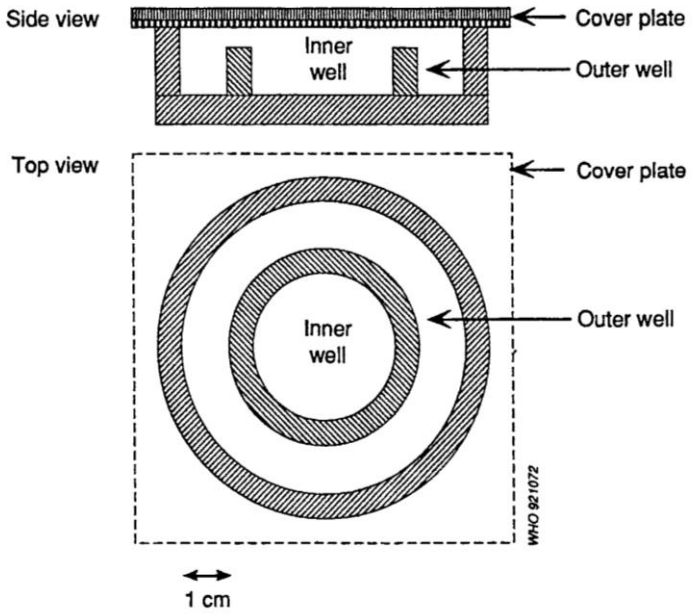
و يمكن تعديل طريقة الاستخلاص اذا كانت طبيعة المادة السامة معروفة

و نادرا ما يشكل الحجم في حالة البول او الرشافة المعدية مشكلة كما هو الحال في الدم .

اما الاختبارات المطبقة على الخلاصة :

- اختبارات لونية بسيطة : و قد تجري على البول مباشرة او على محتويات المعدة او المصل بالاضافة لاجرائها على الخلاصات المحضرة كما سبق .
- الطرق الاستشرابية : تطبق على الخلاصات النقية و منها التفريق اللوني على طبقة رقيقة TLC و هي طريقة سريعة و حساسة و عزلها دقيق و غالبا تستعمل صفائح السيليكاجل مع عدة جمل من المحلات العضوية , و حاليا انتشر استعمال التفريق اللوني الغازي GC و HPLC و هي طرق قوة عزلها عالية و سريعة و يمكن استخدامها للمعايرة الكمية .
- الطرق الطيفية الضوئية : و يستعمل اما طيف الامتصاص بفوق البنفسجي او تحت الاحمر او الطيف المرئي و قد ازداد حاليا الاعتماد على الجمع بين طريقتي الطيف و الاستشراب .

- الانتشار الدقيق Microdiffusion هو وسيلة من وسائل التنقية و الاستخلاص و يستخدم خاصة للمركبات الطيارة مثل HCN في الدم , و تتم هذه العملية في جهاز بسيط يسمى حجرة كونوي Conway
يوضع في وسط الحجرة هيدروكسيد الصوديوم و في القسم الخارجي يوضع في طرف حمض الكبريت و في الطرف المقابل توضع عينة الدم ,
فبوجود السيانيد في الدم فانه يتحرر بتاثير حمض الكبريت و ينطلق في جو الحجرة
و يؤثر في هيدروكسيد الصوديوم الموجودة في القسم المركزي و يتشكل سيانيد الصوديوم
يترك التفاعل في هذه المرحلة مدة ساعتين
يضاف بعدها الى القسم المركزي من الحجرة ماء البروم فيتشكل سيانيد البروم CNBr
القسم الزائد من ماء البروم يتم تخريبه بواسطة زرنيخيت الصوديوم
ثم يضاف مزيج من البيريدين و البنزيدين فيتشكل لون وردي يعاير لونيا



الجلسة العملية الاولى

كشف البقع الدموية

يتطلب الامر في بعض الاحيان في الطب الشرعي كشف البقع الدموية في مكان حدوث الجريمة أو أي مكان اخر يشتبه بوجود الدم فيه ,
تكون بقع الدم موجودة على أداة الجريمة أو على الارضيات أو اثاث و مفروشات المنزل او الثياب و الأقمشة .
و من الجدير بالذكر ان كشف و فحص البقع الدموية يحتاج الى خبرة , و يجب عل المخبري أن يبقي لديه شيئا من العينة كشاهد .
معظم فحوص اللطاخة الدموية تعتدمد على وجود الهيموغلوبين و مركباته (اوكسي هيموغلوبين , كربوكسي هيموغلوبين , ميتيموغلوبين , هيماتين , هيمين) .
ليس كل البقع الحمراء هي بالضرورة دموية فقد تكون اصبغة نباتية المنشأ (يمكن تمييزها بسهولة حيث تعطي لون اخضر بتاثير هيدروكسيد الامونيوم) , أو أصبغة كيميائية مثل الاصبغة المشتقة من الانيلين (تتحول بتاثير حمض الازوت الى اللون الاصفر) , أو مواد مؤكسدة ....
ان لون البقعة الدموية يختلف بحسب :

- عمر البقعة الدموية
- كمية الدم المشكلة للبقعة
- طبيعة الحامل الذي توجد عليه البقعة
- غسل البقعة الدموية يغير لونها فيصبح مائلا للصفرة

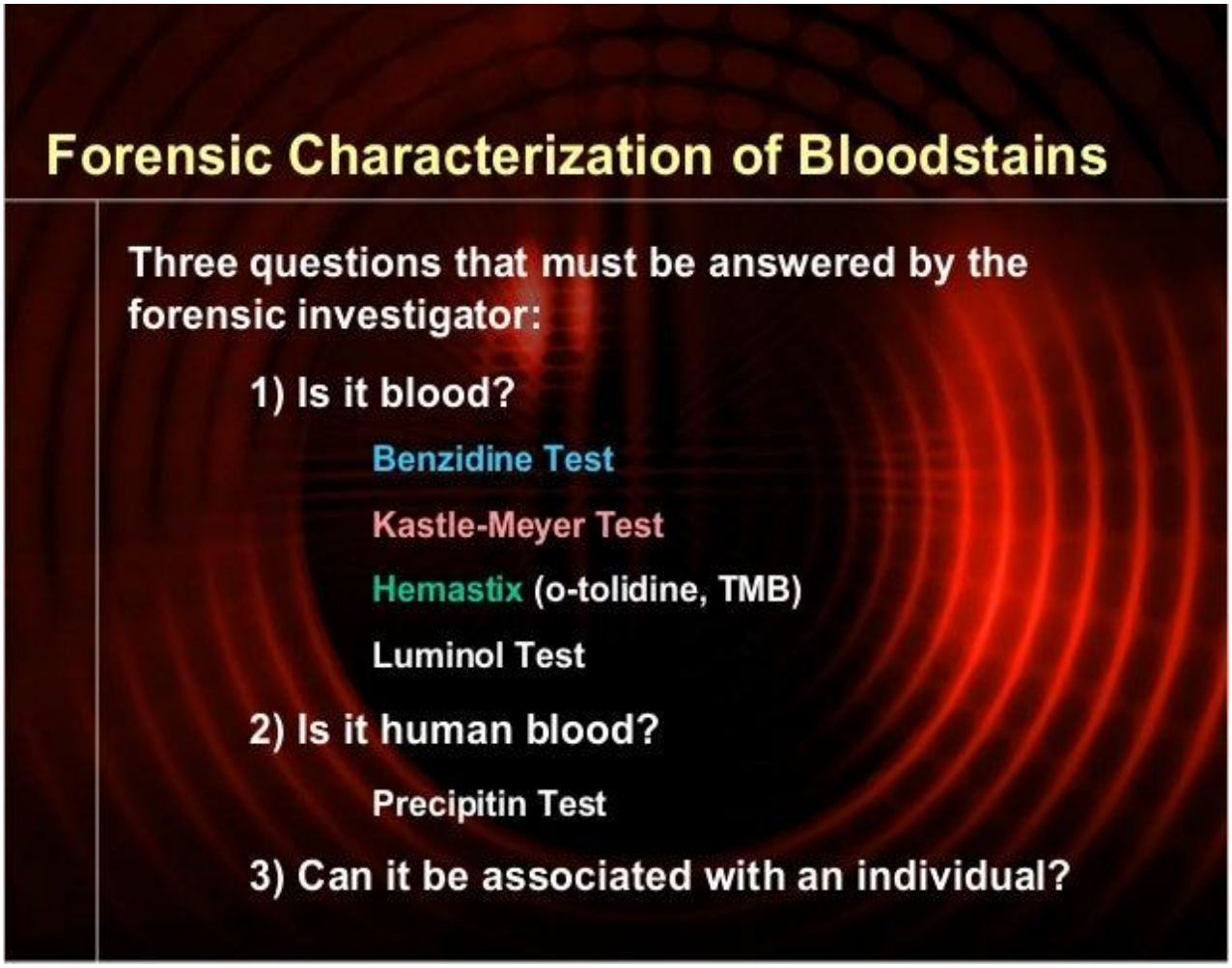
بعد وصول العينة الى المخبر يتم اللجوء الى اختبارات مختلفة للتأكد من طبيعة البقعة :
1 – اختبارات موجهة (اذا كانت ايجابية يجب اجراء اختبارات مؤكدة)
2 – اختبارات مؤكدة

طريقة اخذ العينة :

- **الدم في موقع الحادث حديثا :** تؤخذ في هذه الحالة قطرة بواسطة قضيب زجاجي الرأس و مزلق و توضع على صفيحة زجاجية و تشكل منها مسحة تفحص مجهريا و تشاهد الكريات الحمراء (خالية من النواة و قطرها 6 +-1 ميكرون) الكريات الحمراء للطيور تحوي على نواة) .
  يتعذر فحص الدم بهذه الطريقة بعد مضي انقضاء 4-8 ايام من خروجه من الجسم
- **البقعة الدموية جافة :**
- **البقعة على القماش :** يقص جزء من القماش الملطخ بالدم
- **البقعة على جسم صلب :** تكشط البقعة عن الجسم الصلب
  توضع قطعة القماش المقصوصة او الكشاطة في زجاجة ساعة و تنقع في 2مل ماء فيزيولوجي (لمنع انحلال الكريات الحمراء و الحفاظ عليها بشكلها الطبيعي)
- **اثار الدم موجودة على الاثاث المنزلي او على قطعة خشب او البقعة صغيرة جدا** : يؤخذ في هذه الحالة انطباع البقعة (طريقة تايلر Taylar)و يتم كما يلي :

تؤخذ ورقة ترشيح مغسولة مسبقا بحمض كلور الماء ثم بالماء المقطر و مجففة نماما (للتخلص من اي اثر للحديد فيها) , تبلل الورقة بالماء المقطر و توضع فوق البقعة المشتبه بها مع الضغط عليها بلطف فينحل الدم و يتسرب قسم منه الى ورقة الترشيح (يطبق الكاشف الكيميائي على الوجه الذي انطبع عليه اثر البقعة)

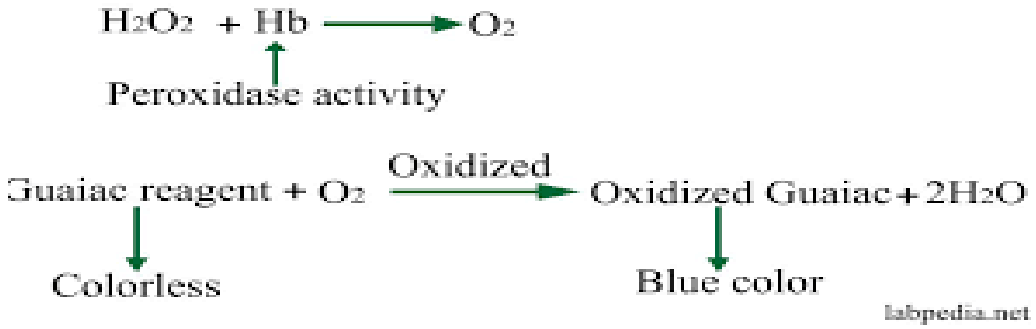
هذه العينات تختم بالشمع الاحمر و ترسل الى المخبر .



فحص العينة :

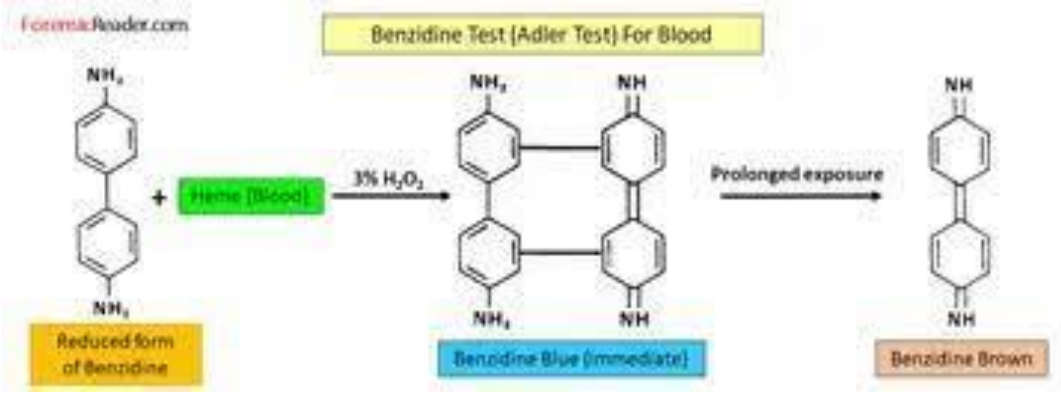
1 – الفحوص الكيميائية الموجهة :

- هي تفاعلات سهلة التطبيق و تعطي نتائج سريعة و حساسة
- هي تفاعلات كيميائية أو طريقة الاوكسيداز
- قبل البدء بتطبيق هذه التفاعلات على اللطاخة او محلولها يجب التحقق من صحة الكواشف المستعملة باجراء تجربة على بياض .
- اذا اعطت نتيجة سلبية فهي تؤكد للمخبري ان اللطاخة المفحوصة ليست من الدم
- اذا اعطت نتيجة ايجابية كان هناك احتمال كبير ان تكون اللطاخة المفحوصة من الدم و يجب على المخبري اجراء فحوص اخرى مؤكدة .
- الية عمل هذه الفحوص هو ان البيروكسيداز الموجودة في الدم (يعمل الهيم في الهيموغلوبين عمل البيروكسيداز تحرر الاكسيجين من الماء الاكسيجيني و الذي بدوره يقوم باكسدة الكاشف المستخدم الى الشكل الملون
- يتم التخلص من البيروكسيداز النباتية بالتسخين للدرجة 100 لمدة 30 دقيقة .



من أهم الفحوص الموجهة :

1 – تفاعل آدلر Adler (التفاعل مع البنزيدين)



تركيب الكاشف : بنزيدين 0.3 g

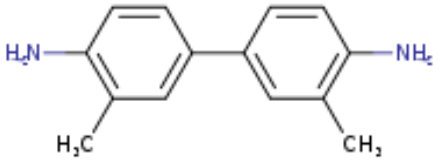
حمض الخل الثلجي 10ml

(يحضر عند اللزوم لانه يتخرب)

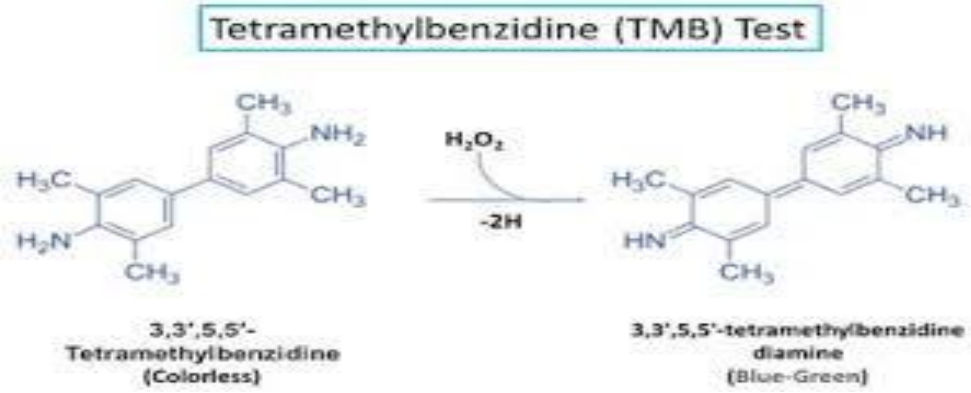
تطبيق الكاشف :

- توضع بضع قطرات من نقاعة البقعة الدموية في زجاجة ساعة ثم يضاف 1 مل من الكاشف ثم قطرتان من الماء الاكسيجيني 3% فيظهر في الحال لون ازرق بوجود الدم
- لاجراء التفاعل على انطباع اللطاخة توضع قطرة من الكاشف فوق مكان الانطباع ثم توضع فوقها قطرة ماء اكسيجيني فيظهر مباشرة لون ازرق ينتشر سريعا في الورقة مع السائل عندما تكون البقعة دموية .

2 – اختبار الاورثوتوليدين Orthotolidine : يتحول من اللون الاصفر الى الازرق المخضر



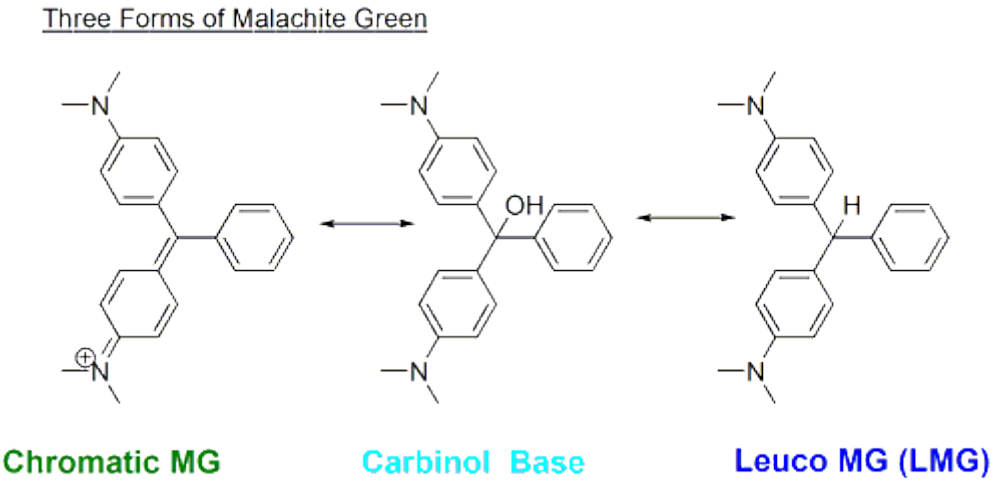
3 – اختبار هيماستيكس Hemastix (Tetramethylbenzidine)



يتحول من اللون الابرتقالي الى الازرق الغامق المخضر

ملاحظة : تستعمل الكواشف السابقة للكشف عن الدم في الطب الشرعي و كذلك للكشف عن الدم الخفي في البراز و كذلك في البول .

4 – التفاعل مع خضرة المالاشيت :



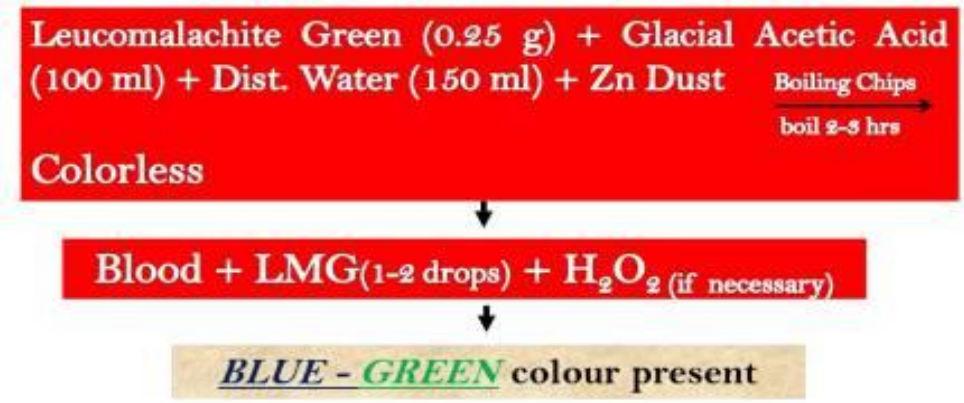
هذا التفاعل حساس جدا و يفيد في كشف البقع الدموية اذا كانت مغسولة .

تركيب الكاشف :

خضرة المالاشيت 1g

حمض خل كثيف 100ml
ماء مقطر 150ml
يضاف الزنك و يغلى لمدة 2 ساعة حتى زوال لون الاخضر
يمزج و يحفظ في زجاجات عاتمة و مغلقة تماما .

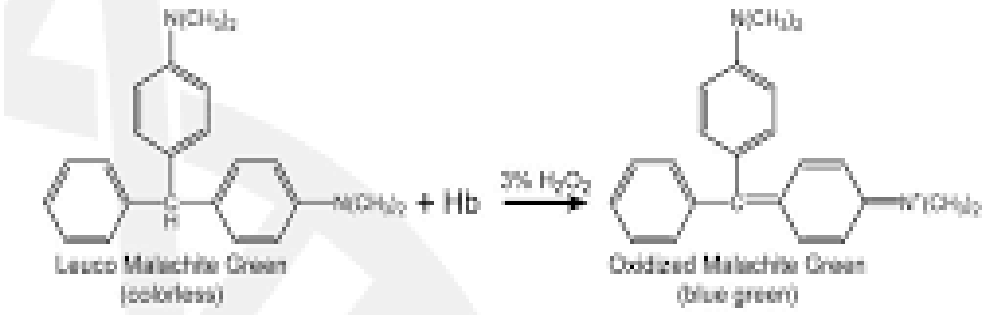
أو يتم تركيبه كالشكل التالي :



تطبيق التفاعل :

يمزج جزء من الكاشف مع 4 اجزاء من الماء الاكسيجيني 10%

- في حالة النقاعة يضاف 1مل من المزيج الى 1مل من محلول النقاعة فيظهر لون اخضر
- في حالة الانطباع يرذ قليل من المزيج على السطح المشتبه به فيظهر لون اخضر

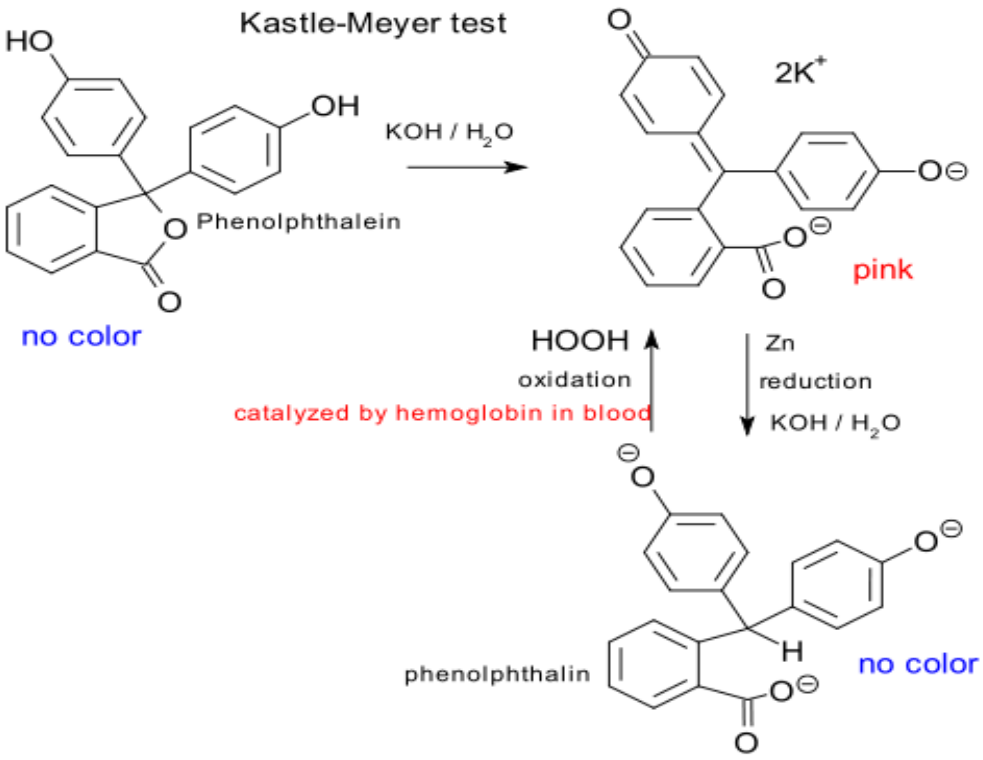


5 – تفاعل كاستل و ماير :

تركيب الكاشف :

فينولفتاليئين 2g
ماء مقطر 100ml
بوتاس لامائي 20g

مسحوق توتياء 12g
يذاب الفينولفتاليئين في الماء المقطر ثم يضاف البوتاس فيتلون المحلول بلون احمر بعد التحريك يضاف مسحوق التوتياء و يغلى مع التحريك حتى زوال اللون , يرشح المحلول و يحفظ في زجاجات عاتمة محكمة الاغلاق .

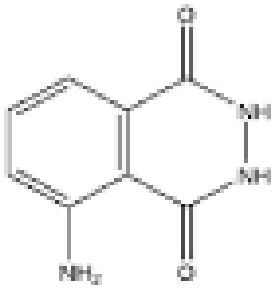


تطبيق التفاعل :
يطبق هذا الكاشف على النقاعة حيث يوضع في انبوب اختبار 2مل من محلول النقاعة و يضاف 1مل كاشف ثم 3 قطرات ماء اكسيجيني 12% يخض جيدا فيبدو في الحال لون احمر بوجود البقعة الدموية .

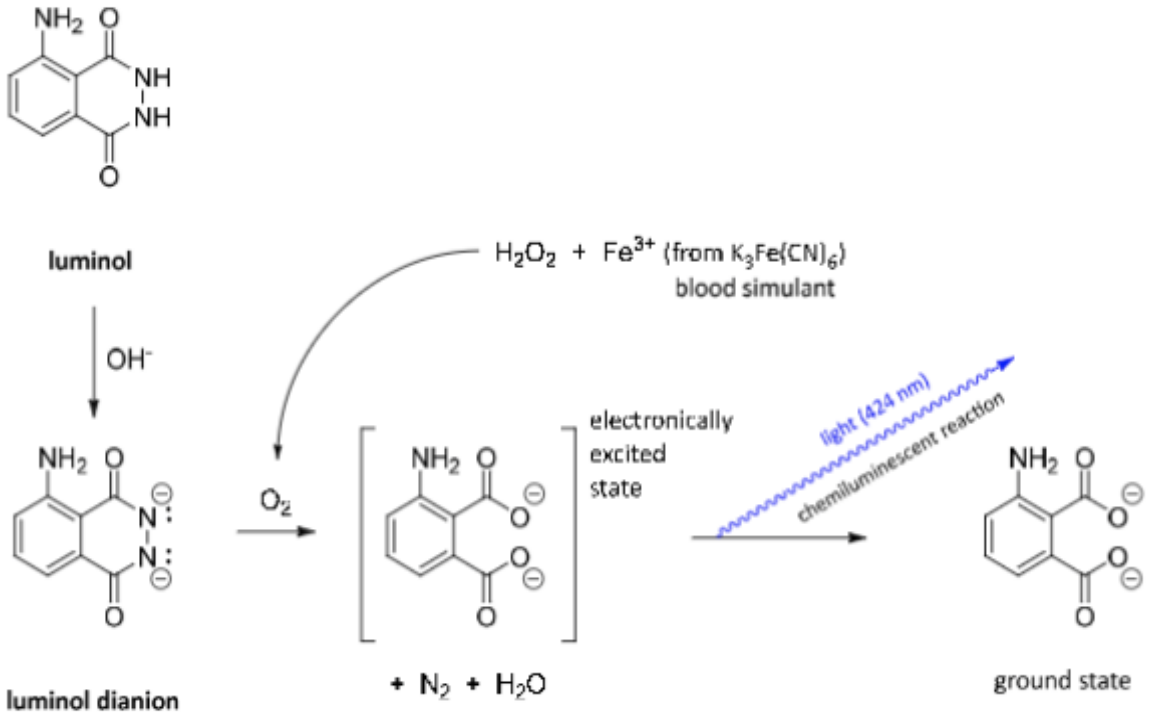
6 – اختبار اللومينول Luminol : (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione)
هو من اكثر التفاعلات حساسية حتى البقع المعسولة و الاثار الضئيلة جدا من الدم
يتحول الكاشف بوجود الدم من عديم اللون الى ازرق مشع

Luminol

- Redox reaction with oxygen in the presence of catalyst produces a bright blue glow.
- Used in forensic analysis for detection of blood
  - Iron in hemoglobin acts as catalyst
- Other common catalysts
  - Biological: copper and cyanide
  - Laboratory: potassium ferricyanide



Luminol
5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione



ملاحظات :

- تعطي التفاعلات السابقة تفاعل ايجابي مع الصدا و القيح و اللعاب و البول اذا كان مدمى و مع عصائر الفواكه و الخضروات الحاوية على البيروكسيداز و مع الحليب
- تعطي املاح النحاس و مؤكسدات اخرى نتائج ايجابية كاذبة و ذلك قبل اضافة الماء الاكسيجيني لذلك يحكم بعدم وجود الدم في كل نتيجة تحصل فيها هذه الحالة .

الفحوص المؤكدة :

تعتمد على كشف الهيموغلوبين في اللطاخة لتاكيد طبيعتها الدموية

1 – الفحص الطيفي :

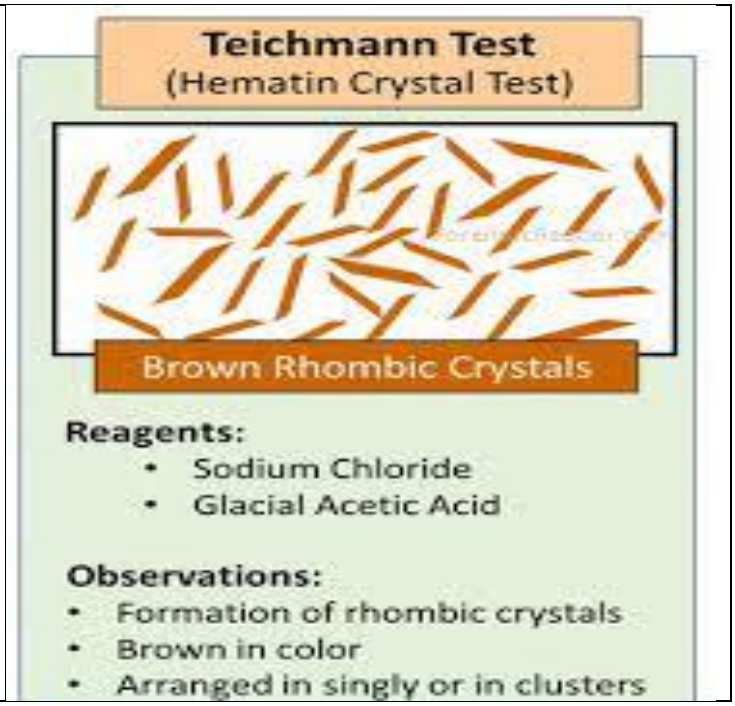
- ان وجود طيف امتصاص احد مشتقات الهيموغلوبين في منقوع البقعة المشتبهة يؤكد طبيعتها الدموية
- تختلف مشتقات الهيموغلوبين الموجودة في البقعة الدموية باختلاف عمرها و باختلاف المركبات الكيميائية التي اثرت بها
- اذا كانت اللطاخة حديثة فانها تحتوي على اوكسي هيموغلوبين و الذي يتميز طيفه بعصابتي امتصاص واقعتين في الطيف الاصفر 567nm و ما بين الاصفر و الاحمر 540nm
- الهيموغلوبين المرجع له طيف امتصاص مؤلف من شريط واحد عريض يقع بين الخطين السابقين , و يشاهد هذا الطيف ايضا بعد ارجاع الدم الحديث بواسطة احد المرجعات مثل تحت كبريتيت الصوديوم
  (يضاف 0.5g من مسحوق تحت كبريتيت الى محلول النقاعة و ينظر بالعين المجردة الى المزيج من خلال المطياف فيتضح شريط الهيموغلوبين المرجع)
- اذا تشكل الطيفان الخاصان بالاوكسي هيموغلوبين و كذلك الطيف المرجع فان ذلك يؤكد وجود الدم

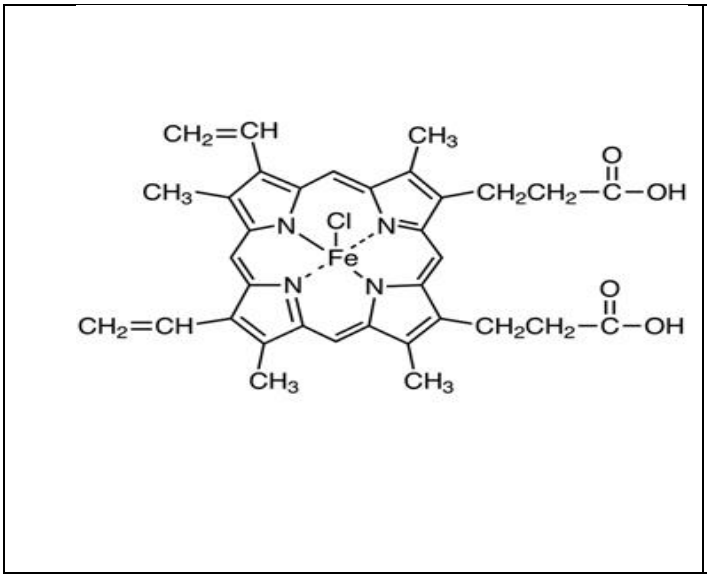
ملاحظة : الاوكسي هيموغلوبين يتحول بعد فترة الى هيموغلوبين مرجع و الذي يتحول الى ميتهيموغلوبين ثم الى هيماتين حمضي و اللطخ الاكثر قدما تحوي على الهيماتوبورفيرين

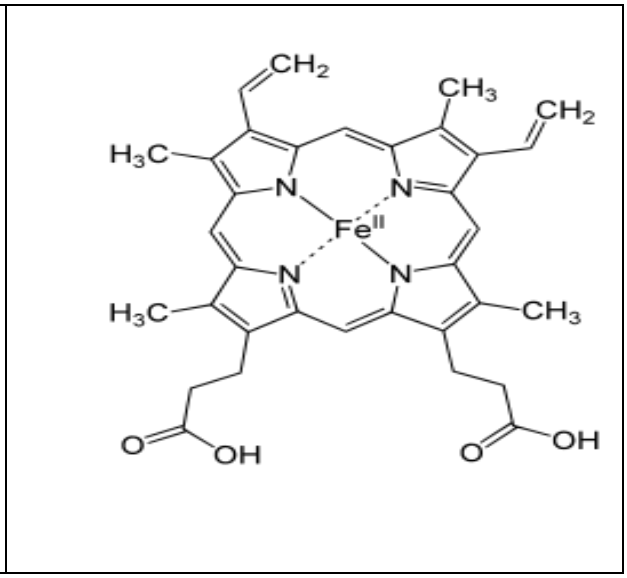
يمكن اجراء الطريقة السابقة كما يلي :
توضع بقعة الدم على صفيحة زجاجية و يوضع عليها قطرة البوتاس المركز (يتكون الهيماتين اعتبارا من الهيموغلوبين ثم يضاف قطرة من كبريت الامونيوم الذي يحول الهيماتين الى هيموكروموجين Hemochromogene , يغطى المحلول الناتج بساترة و تفحص بمنظار الطيف لمشاهدة طيف الهيموكروموجين الذي يتصف بخطين امتصاصيين بين الاصفر و الاخضر . (يتعذر هذا الفحص بوجود الصدا بسبب تكون كبريت الحديد الاخضر بتاثير كبريت الامونيوم لذلك يستبدل كبريت الامونيوم في التفاعل السابق بالبيريدين و ان كان التفاعل بطيئا)

2 – تشكل بللورات الهيمين (بللورات تايشمان) :

تؤخذ قطرة من محلول اللطاخة و توضع على صفيحة زجاجية و تجفف على لهب خفيف (اقل من 45 درجة)
(او يؤخذ شيء من كشاطة البقعة الدموية و توضع على الصفيحة الزجاجية)
تستر بساترة ثم يدخل تحت الساترة بواسطة ممص قطرتان من محلول تايشمان الذي يتكون من :
(1غ من كل من يوديد البوتاسيوم و بروميد البوتاسيوم و كلوريد البوتاسيوم في 100 مل حمض خل كثيف)
تسخن الصفيحة على لهب خفيف مع الحرص على عدم الوصول الى درجة الغليان , ثم تترك الصفيحة لتبرد ثم تفحص بالمجهر فتظهر بللورات موشورية الشكل تدعى بللورات تايشمان .







ملاحظات :

- تسخين الصفيحة تسخين مناسب يعطي نتائج جيدة بينما التسخين غير الكافي يؤدي الى ظهور حبيبات صغيرة بنية اللون من كلورهيدرات الهيماتين عوضا عن البللورات الموشورية , و التسخين الزائد تتشكل بللورات ذات نهاية منتفخة تفقد شكلها الموشوري .
- يجب ان يتم الفحص في وسط خالي من الماء لذلك يجب التجفيف جيدا قبل الفحص و يجب ان يكون حمض الخل خاليا من الماء .
- يمكن استعمال محلول كاشف غير السابق (خطة برتران Bertrand) و يتكون من : كلوريد المغنزيوم المبلور و حمض الخل الثلجي و الغليسيرول (يسمح هذا الكاشف بالحصول على بللورات الهيمين بسرعة) .

تعيين منشأ الدم :

بعد التاكد من البقعة بانها دموية يجب في هذه الحالة تعيين مصدر الدم بشري ام حيواني

و يعتمد على الاغلب على استعمال تفاعلات الترسيب او طريقة تعديل المصل المضاد للغلوبولين البشري او مصل كومبس , او طريقة التراص المنفعل للكريات الحمراء .

تفاعلات الترسب :

يتألف الكاشف الضد للمص من مصل ارنب حقن 5-6مرات بمصل الانسان و اخذ بعد 5 ايام على الاقل بعد اخر يوم من الحقن (يتشكل اضداد عند الارنب) '(يرسب هذا المصل مصل الانسان و هو تفاعل وصفي جدا)

تؤخذ كشاطة البقعة الدموية او جزء صغير من القماش مكان البقعة و توضع في زجاجة ساعة ثم يضاف لها قليل من المصل الفيزيولوجي و تترك لمدة 12-24ساعة بدرجة حرارة 4 مئوية و ذلك وفقا لعمر البقعة ,

و يمكن اذا كانت البقعة قديمة ان تحضن فترة اطول , و يمكن لزيادة او تسهيل الذوبان اضافة بضع قطرات من سيانيد البوتاسيوم 1% .

يجب تنظيف البقعة من الشوائب اذا وجدت مختلطة مع البقعة قبل نقعها في المصل الفيزيولوجي , و يتم ذلك باستعمال بعض المذيبات مثل الكحول او الايتر او الماء حسب طبيعة التلوث .

ثم يؤخذ منقوع البقعة و يثفل حتى يصبح رائق تماما و تختبر درجة PH بورقة عباد الشمس حيث يجب ان يكون الوسط معتدل التفاعل (يمكن اضافة قطرات من كربونات الصوديوم او حمض الطرطير لتعديل درجة الحموضة)

يمكن اجراء تفاعل المصل المرسب اما بطريقة الانابيب أو بطريقة الانتشار المناعي في الهلام .

طريقة الانابيب :

يؤخذ 1 مل من محلول مائي 1 بالالف من المصل المراد فحصه يرشح او يثفل ثم يضاف اليه بضع قطرات من المصل المرسب , يمزج ثم يوضع في حمام مائي حرارته 37 قيتكون راسب في اقل من نصف ساعة بوجود دم انسان .

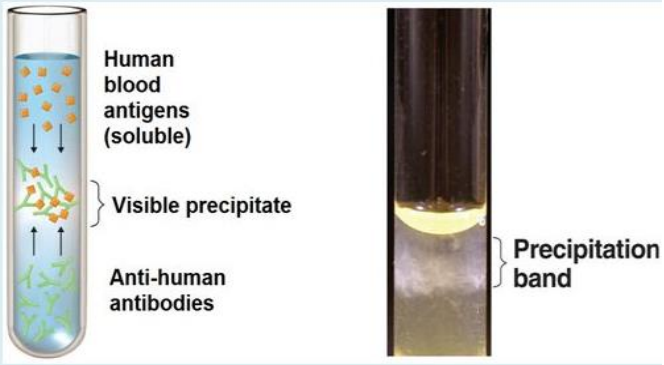
غير ان نتيجة هذا التفاعل لاتصح الا بوجود شواهد , و تجهز من اجل ذلك سلسلة من انابيب التجربة :

رقم الانبوب	المواد (1مل من المحاليل الممددة بنسبة 1 بالالف)
1	ماء مقطر
2	محلول فيزيولوجي
3	محلول الدم المراد فحصه
4	محلول دم حديث
5	محلول دم ثور
6	محلول دم خنزير

يضاف الى كل انبوب 4- 5 قطرات من المصل المرسب ثم توضع الانابيب في حمام مائي درجته 37 مئوية لا تكون النتيجة صحيحة الا اذا ترسب محتوى الانابيب التي تحتوي على دم الانسان .

Precipitin Test

- Serum made in rabbit contains antibodies against human blood
- Crime scene blood is layered on top of the anti-human serum in a test tube
- If the sample is positive for human blood, a cloudy precipitate will form where the 2 layers meet



عمر البقعة الدموية :

يختلف لون البقعة الدموية تبعا لعمر اللطاخة (من الاحمر الى البني الرمادي)

- يذوب الهيموغلوبين في الماء بسهولة معطيا لون احمر
- بعد انقضاء بضعة ايام ينقلب الهيموغلوبين الى ميتهيموغلوبين بني اللون و قليل الانحلال في الماء
- و بعد فترة ينقلب الى هيماتين غير ذواب في الماء و لكنه يذوب في الحموض و القلويات الممددة
- اذ انقلب الى هيماتوبورفيرين لا يذوب الا في الحموض و القلويات الكثيفة .

ملاحظة : لون اللطاخة الدموية يتعلق بحرارة الجو و الرطوبة و كمية الدم و تعرضها للهواء و الضوء و طبيعة الحامل الذي توجد عليه البقعة الدموية (على الزجاج تبقى حمراء لمدة طويلة بينما على الاقمشة الصوفية تاخذ لونا داكنا في وقت اقل من الموجودة على القطن او الحرير) .

تحديد مصدر الدم و هويته :

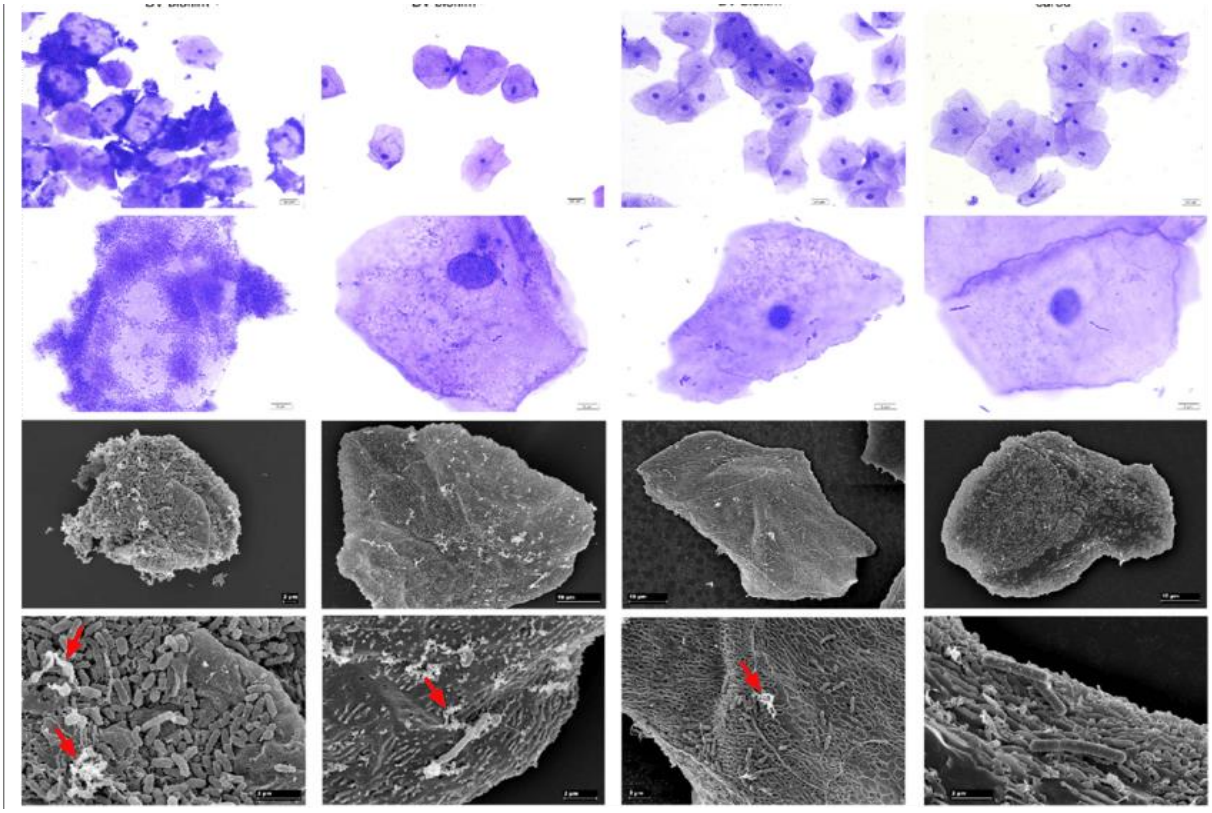
- تتم معرفة الدم عائد لانسان او اخر بتعيين الزمرة الدموية و تحديد DNA

Blood & DNA Testing

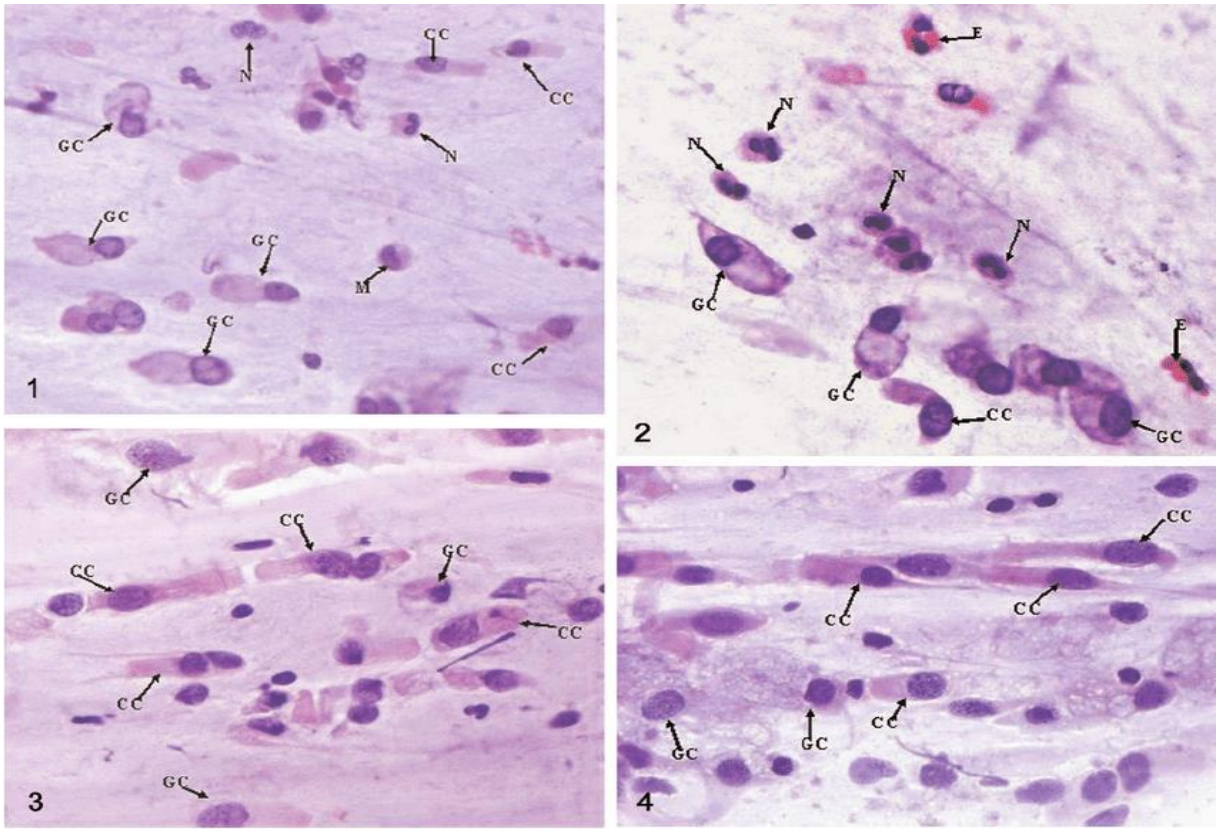
Blood is used in DNA testing, as shown by the following steps:
1. Blood samples are collected from the victim, defendant, and crime scene.
2. White blood cells are separated from red blood cells.
3. DNA is extracted from the nuclei of white blood cells.
4. A restrictive enzyme is used to cut fragments of the DNA strand.
5. DNA fragments are put into a bed of gel with electrodes at either end.
6. Electric current sorts DNA fragments by length.
7. An absorbent blotter soaks up the imprint; it is radioactively treated, and an X-ray photograph, called an autoradiograph, is produced.

- مصدر الدم يتم تحديده بالاعتماد على الفحص الخلوي للبقعة حيث يتم الفحص المجهري لجزء من البقعة و يميز هذا الفحص بين مجموعات و اشكال الخلايا في منقوع البقعة .

يوضع جزء من المنقوع على صفيحة زجاجية يجفف و يثبت ثم يلون بالهيماتوكسيلين –ايوزين :
خلايا بطانة الرحم و المهبل تتميز بكونها متعددة الاضلاع مثنية الحجواف نواتها صغيرة مركزية مدورة تحتوي على حبيبات الغليكوجين التي يمكن اظهارها بعد تلوين العينة بمحلول لوغول .
دم الرعاف يتميز بوجود خلايا ظهارية مهدبة من بطانة الانف .



خلايا مهبلية



خلايا بطانة الانف

التقرير و الملاحظات حول التجربة

ملاحظات المشرف :

توقيع المشرف :