جامعة المنارة

كلية: طب الأسنان

اسم المقرر: الأحياء الدقيقة

السنة: الأولى

الفصل الدراسي **الثاني**

العام الدراسي **2023-2022**

جدول المحتويات

Contents

العنوان	رقم الصفحة
الجلسة العملية الأولى قواعد السلامة المخبرية Laboratory safety rules المجهر الضوئي المركّب Compound Light Microscope	3
الجلسة العملية الثانية التعقيم Sterilization والتطهير Disinfection	9
الجلسة العملية الثالثة الأوساط الزرعية Culture media	14
الجلسة العملية الرابعة جمع العينات للفحص الجرثومي	23
الجلستان العمليتان (الخامسة + السادسة) طرائق الزرع الجرثومي Bacterial Culture Methods خصائص المستعمرات الجرثومية Bacterial Colonies Characteristics	29
الجلستان العمليتان (السابعة + الثامنة) الفحص المجهري المباشر Direct microscopic exam التلوين البسيط Simple Stain تلوين غرام Gram Stain	39
الجلستان العمليتان (التاسعة + العاشرة) اختبار التحسس للصادات الحيوية Antibiotic Susceptibility Test الاختبارات المصلية Serological Test	47

الجلسة العملية الأولى

قواعد السلامة المخبرية Laboratory safety rules

المجهر الضوئي المركّب Compound Light Microscope

الأهداف

نهدف من هذه الجلسة إلى:

1. التعرّف على إجراءات الأمان والسلامة المتبعة في مختبر الأحياء الدقيقة.
2. التعرّف على أنواع المجاهر المستخدمة في الدراسات الخلوية.
3. التعرّف على المجهر الضوئي المركّب والمكبّرة الضوئية.

المحتوى العلمي

❖ قواعد الأمان والسلامة في مختبر الأحياء الدقيقة

- **عند الدخول إلى المختبر:**

1. الالتزام بالحضور في الوقت المحدد.
2. عدم دخول إلى المختبر من دون وجود المشرف.
3. ارتداء رداء العمل المخبري (المريول الأبيض)، وربط الشعر الطويل.
4. الجلوس في المكان بهدوء وعدم الاتكاء على الطاولة، مع المحافظة على النظام.
5. اصطحاب الدفتر المخصص للجانب العملي، والأدوات المساعدة.
6. وضع الكتب والحقائب في حال وجودها في مكان آمن بعيد عن مكان تنفيذ التجربة.
7. عدم تناول الطعام أو الشراب داخل المختبر؛ لأن ذلك قد يعرضك للمخاطر.

- **أثناء تنفيذ التجربة أو النشاط المطلوب:**

1. التقيّد بالإرشادات والتوجيهات التي يقدمها المشرف.
2. غسل اليدين جيداً بالماء والصابون قبل البدء بالتجربة، ومن ثم ارتداء القفازات الطبية.
3. مسح منطقة العمل بالمطهّر، وتركها لتجف بالهواء قبل البدء بتنفيذ التجربة.
4. عدم العبث بأي شيء تجهله سواء أجهزة أو أدوات.
5. عدم لمس مآخذ الكهرباء واليد مبتلة بالماء، وعدم العبث بمفاتيح الغاز.
6. تجنّب تلويث الأحواض وطاولات العمل بالصبغات.
7. عدم حمل المزارع الجرثومية والتنقل بها في المختبر تجنباً للتلوث.
8. وضع العينة وإبرة الزرع في المكان المخصص لها.

9. إخبار الأستاذ المشرف عن أي مشكلة قد تقع (جرح، حرق، كسر زجاجيات، تعطّل جهاز....)، مع المحافظة على حسن التصرف والهدوء.
10. تسجيل الملاحظات والنتائج التي تم توصل إليها بشكل مستمر ومتتابع.
11. اعتماد العمل بروح الفريق مع بقية الزملاء.

- **بعد الانتهاء من تنفيذ التجربة أو النشاط:**

1. إلقاء العينات بعد الانتهاء من العمل بها والأدوات المستعملة (التي تستخدم لمرة واحدة) في الأماكن المخصصة لذلك.
2. تنظيف الأدوات المستخدمة وطاولة العمل جيداً.
3. ترتيب الأجهزة والأدوات المستخدمة وإعادتها إلى مكانها المخصص.
4. التأكد من إغلاق كل من: مفاتيح الكهرباء - مصادر الغاز - صنابير الماء.
5. نزع القفازات وإلقاؤها في المكان المخصص، ومن ثم غسل اليدين جيداً بالماء والصابون قبل الخروج من المختبر.

- **عند التعامل مع المواد الكيميائية:**

1. عدم تذوق أو شم أو لمس أية مادة كيميائية (وخاصة تلك التي تكون ضمن عبوات لا تحمل أية لصاقه أو أية إشارة إلى نوع وماهية المادة الموجودة ضمنها).
2. حمل العبوات بحذر، واستخدام الكمية المطلوبة والمحددة حسب التجربة.
3. بقاء الأيدي بعيدة عن الوجه والعينين والفم والجسم أثناء استخدام المواد الكيميائية.
4. الغسل بالماء عند تطاير المواد الكيميائية على العينين، أو مسحها بورق نشّاف إذا لامست الجسم لمنع انتشارها لمساحة أكبر.
5. استخدام الحمام المائي عند تسخين المواد الكيمائية وخاصة القابلة للاشتعال (عدم تعريضها للمصدر الحراري بشكل مباشر).
6. التأكد من أن مصادر اللهب مغلقة عند استخدام مواد قابلة للاشتعال.
7. التخلص من نواتج التجارب مباشرة وبعد الانتهاء من الجلسة العملية، ووضعها في الأماكن المخصصة لذلك.

- **القواعد الأساسية للتعامل مع الجراثيم بمستوى الأمان الحيوي الأول (BSL 1)**

إن التعامل مع الجراثيم الحية حتى تلك التي تعد غير ممرضة، يتطلب قواعد خاصة إضافة إلى تلك التي أشرنا إليها آنفاً، فكل الجراثيم من المحتمل أن تكون ممرضة خاصة إذا تمكنت من الدخول إلى الجسم البشري، لذا يجب التقيد بالقواعد الآتية عند التعامل مع الجراثيم ذات مستوى الأمان الحيوي الأول:

1. عدم وضع أي شيء في الفم أثناء القيام بالزرع، وعدم السحب بالفم واستخدام ماصة بدلاً عن ذلك، وإبقاء اليدين أو القلم بعيداً عن الفم والأنف والعينين.

2. عند القيام بالزرع يجب تعقيم العروة أو الإبرة باللهب قبل وضعها على الطاولة.
3. إبقاء الأنابيب دائماً في حامل الأنابيب عندما تتعامل مع الوسط السائل، وعدم اسنادها على الطاولة لأن ذلك سيؤدي لإراقة السائل منها.
4. في حال سكب وسط الزرع، يجب تغطية السكابة بمنشفة ورقية غمرها بالمطهّر، واعلام الأستاذ المشرف بذلك.
5. تعقيم كافة النفايات الناتجة عن تنفيذ التجربة (أوساط زرعية، ماصات، شرائح زجاجية، ماسحات....) ورميها في مكان مخصص.
6. في حال حدوث جرح أو حرق يُعلم المشرف، ليتم تطبيق الإسعافات الأولية، ويفضّل التوقف عن العمل.

من الأنواع الجرثومية التي تصنّف ضمن مستوى الأمان الحيوي الأول (التي لا يعرف عنها أنها تسبب مرضاً دائماً للبالغين الأصحاء) نذكر:

Bacillus subtilis, Escherichia coli.

- **القواعد الأساسية للتعامل مع الجراثيم بمستوى الأمان الحيوي الثاني (BSL 2)**

إن التعامل مع الجراثيم الممرضة في المختبر يتطلب قواعد أمان خاصة، إضافة إلى قواعد الأمان العامة، وقواعد الأمان في مستوى الأمان الحيوي الأول (BSL 1)، لذا يجي التقيّد بالقواعد الآتية عند التعامل مع الجراثيم ذات مستوى الأمان الحيوي الثاني (BSL 2):

1. يجب ألا يتواجد في المختبر إلا الأخصائيين الذين يعملون فيه.
2. يجب أن يترك المريول في مكان محدد ضمن المختبر بعد الانتهاء من العمل، وعدم إخراجه.
3. العمل الدائم داخل غرفة العزل لتفادي تشكّل الضباب أو الرذاذ أثناء التعامل مع الجراثيم الممرضة في جو المختبر.

من الأنواع الجرثومية التي تصنّف ضمن مستوى الأمان الحيوي الثاني نذكر:

Salmonella typhi, Staphylococcus aureus, Shigella flexneri, Klebsiella pneumoniae. .....

❖ المجاهر

أولاً: المجاهر الضوئية Light Microscope

– المجهر الضوئي المركّب Compound Light Microscope

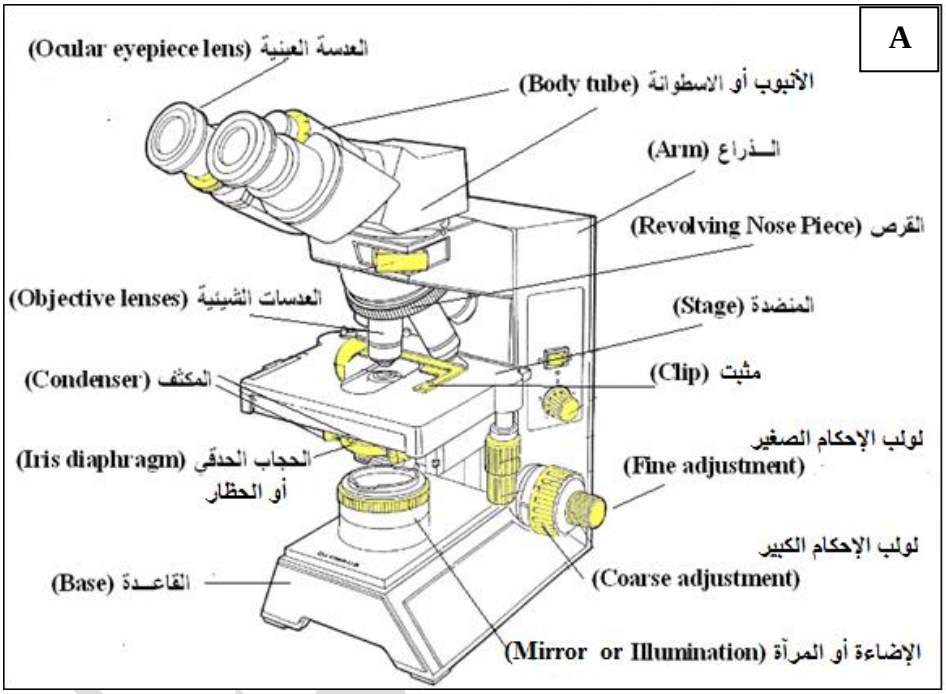
يستخدم الضوء المرئي ونظام العدسات لتكبير الأجسام الصغيرة التي لا ترى بالعين المجردة، وهو من أبسط المجاهر الضوئية.

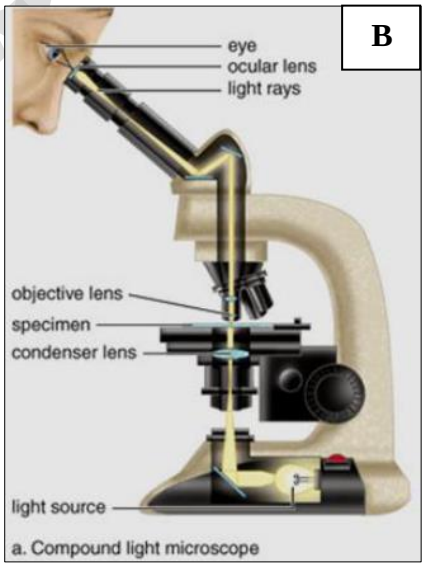
يتركب المجهر الضوئي بشكل عام من أجزاء أساسية هي: الجزء الآلي، والجزء البصري، والجزء الضوئي الشكل (1):

1- الجزء الآلي يضم: القاعدة المعدنية، الذراع، منضدة الشرائح، مثبّت الشرائح، الأسطوانة أو الأنبوب، القرص المتحرك الذي يحمل العدسات الشيئية أو الجسمية، لولبي الإحكام الصغير والكبير.

2- الجزء البصري يضم: العدسات العينية (تكبير 10 X)، العدسات الجسمية أو الشيئية ذات تكبيرات مختلفة (4 X, 10 X, 40 X, 100 X) وتسمى العدسة ذات التكبير (100 X) بالعدسة الغاطسة ويحتاج لاستعمالها قطرة من زيت الأرز توضع فوق الشريحة الزجاجية المراد دراستها.

3- الجزء الضوئي يضم: جهاز الإضاءة المؤلف من المصدر أو المنبع الضوئي الكهربائي والمرآة والمكثف والحظار أو الحجاب الحدقي لتنظيم كمية الضوء.





الشكل (1): (A) الأجزاء المختلفة للمجهر الضوئي المركّب، (B) آلية العمل ومسار الضوء ضمن المجهر الضوئي المركّب.

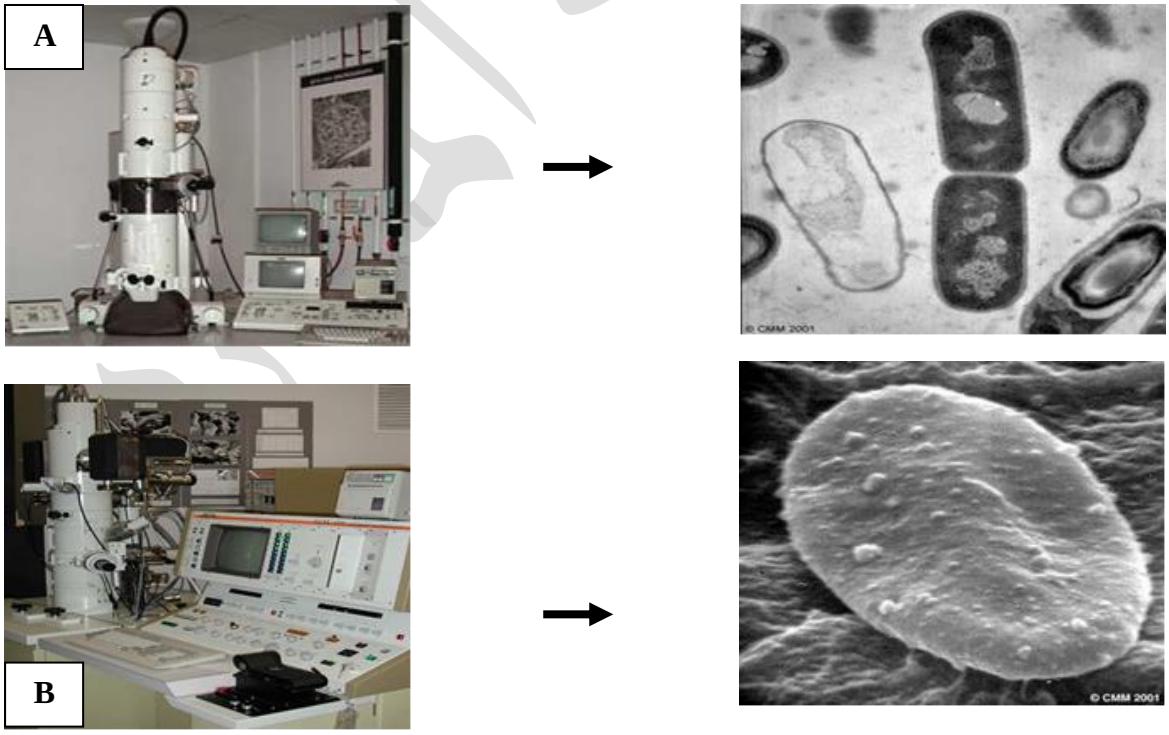
من أنواع المجاهر الضوئية أيضاً:

1. المجهر ذو القعر المظلم Dark-field Microscope.
2. مجهر الفلورة Fluorescence Microscope.
3. مجهر الأشعة المتداخلة Interference Microscope.
4. المجهر المتباين الأطوار Phase-Contrast Microscope.
5. المجهر المستقطب Polarizing Microscope.

ثانياً: المجاهر الإلكترونية Electronic Microscope

يستخدم فيها حزمة من الإلكترونات بدلاً من الضوء العادي، ويرسل الخيال النهائي إلى شاشة أو فيلم آلة تصوير بدلاً من العين التي لا تستطيع رؤية الأمواج الإلكترونية.

إن اكتشاف المجهر الإلكتروني الماسح **Scanning Electron Microscope (SEM)** المستخدم لدراسة السطح الخارجي للخلية، وكذلك المجهر الإلكتروني النافذ الذي يستخدم لدراسة المحتويات الداخلية للخلية **Transmission Electron Microscope (TEM)** الشكل (2)، قد شكّل ثورة علمية حقيقية في دراسة الخلية ومكوناتها الدقيقة؛ إذ يسمحان برؤية ثلاثية الأبعاد للعينة، ويعتمدان على حزمة دقيقة جداً من الإلكترونات التي تمر بسرعة على سطح العينة، ليذهب الخيال ويرتسم على شاشة خاصة.



الشكل (2): (A) المجهر الإلكتروني النافذ، (B) المجهر الإلكتروني الماسح.

❖ **المكبّرة الضوئية:**

تشبه في تركيبها المجهر الضوئي العادي إلى حد ما الشكل (3)، تستخدم لدراسة أبعاد العينة (مثلاً: أجزاء الحشرات والديدان، أجزاء الحيوانات المشرحة.... الخ) أي دراسة العينات التي لا تحتاج إلى تكبير قوي.

الشكل (3): المكبّرة الضوئية.

انتهت الجلسة الأولى ... بالتوفيق للجميع

الجلسة العملية الثانية

التعقيم Sterilization والتطهير Disinfection

الأهداف

نهدف من هذه الجلسة إلى:

1. التعرّف على مفهوم التعقيم وطرقه.
2. التعرّف على مفهوم التطهير وطرقة.
3. تحديد وسائل التعقيم والتطهير والتنظيف المتبعة في مخبر الأحياء الدقيقة.

المحتوى العلمي

أولاً: تعاريف ومفاهيم

- التعقيم **Sterilization**: هو قتل جميع أنواع الأحياء الدقيقة (جراثيم، فيروسات، طفيليات، فطريات)، سواء بأشكالها الإغتذائية أو في حالة الأبواغ، باستخدام طرق فيزيائية أو كيميائية.
- **التطهير Disinfection**: هو جعل الأشياء المراد تطهيرها أو الأيدي أو الجلد خالية من العوامل الممرضة (باستثناء الأبواغ الجرثومية، وبعض الكائنات المقاومة إن وجدت والتي تنجو من تأثير المطهرات).
- **مضادات الانتان (المطهّرات) Antiseptic**: هي المواد الكيمياوية المستخدمة للقضاء على العوامل الممرضة على الأنسجة الحية (الجلد والأغشية المخاطية) لكنها غير قابلة للإعطاء جهازياً مثل الكحول.
- **التنظيف Cleaning**: هو عملية إزالة الغطاء العضوي والغبار والأوساخ، وتتم هذه العملية عادة بالماء والصابون والمنتجات الأنزيمية (ملاحظة: يجب أن يسبق التنظيف كل من عمليتي التعقيم والتطهير بشكل دائم).
- تم تصنيف الأدوات الخاصة برعاية المرضى على أنها حرجة وشبه حرجة وغير حرجة وفقاً لدرجة خطورة العدوى التي ينطوي عليها استخدام هذه الأدوات:
  - **الأدوات الحرجة Critical Items**: تنطوي على مخاطر عالية لإحداث العدوى إذا كانت ملوثة بالأحياء الدقيقة. وبالتالي، يجب أن تكون الأدوات معقمة (بطرق فيزيائية أو كيميائية) كونها ستدخل إلى أنسجة الجسم وأجوافه العقيمة أو جهاز الدوران، ذلك لأن أي تلوث جرثومي يمكن أن ينقل المرض. تشمل هذه الفئة: الأدوات الجراحية، والقسطرة القلبية والبولية، والطعوم، والمحاقن.
  - **الأدوات نصف الحرجة Semicritical Items**: هي الأدوات التي تلامس الأغشية المخاطية أو الجلد غير السليم. تشمل هذه الفئة أجهزة العلاج التنفسي والتخدير، وموازين الحرارة، وبعض

المناظير الداخلية. تتطلب تطهير عالي المستوى باستخدام المطهرات الكيميائية (الغلوتلر ألدهيد، بيروكسيد الهيدروجين).

- **الأدوات غير الحرجة Noncritical Items**: هي الأدوات التي تلامس الجلد السليم فقط وليس الأغشية المخاطية، وتضم: أجهزة قياس الضغط، وأغطية الأسرّة في المشافي، بالإضافة إلى الأسطح (قضبان السرير وبعض أدوات الطعام وطاولات السرير وأثاث المرضى والأرضيات) يزال تلوثها بتطهير متوسط إلى منخفض المستوى (الكحولات).

ثانياً: التطهير

يتم باستخدام طرق فيزيائية أو كيميائية:

- **الطرق الفيزيائية:**

❖ **الغليان Boiling**: رفع درجة الماء حتى 100 درجة مئوية ولمدة من 10 لـ 20 دقيقة، وهي مفيدة في حالات الطوارئ في حال عدم توفر وسائل للتعقيم. هذه الطريقة تقتل معظم الأشكال الإعاشية النشطة (الإغتذائية)، ولكنها لا تستطيع قتل الأبواغ والجراثيم والفيروسات المقاومة.

❖ **البسترة Pasteurization**: التعقيم بالدرجة 60 إلى 65 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة، أو بالدرجة 72 درجة مئوية لمدة من 10 إلى 20 ثانية، ثم تبريد سريع، تقضي هذه الطريقة على عوامل ممرضة نشطة مهمة كعصية السل، والبروسيلا، والسالمونيلا، ولكنها لا تقضي على الأبواغ.

❖ **الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet (UV)** بطول موجة (250-260 nm): أشعة غير مشرّدة (غير متأينة Nonionizing) لتطهير الهواء من الجراثيم والسطوح في غرف العمليات والمخابر (خارج أوقات العمل)؛ حيث تعمل هذه الأشعة على منع تضاعف الـDNA الجرثومي وبالتالي توقف النمو الجرثومي.

- **الطرق الكيميائية:**

❖ **الكحوليات Alcohols**: مثل الكحول **الايتيلي** (70%)، و**الايزوبروبيلي** (70%)، يجب التعرض لها لمدة 5 دقائق، يفضّل تمديد الكحول المطلق بالماء لأن الماء يساعد الكحول في تأثيره القاتل للجراثيم.

❖ **الكلورهيكسيدين Chlorhexidine**: يستخدم بنسبة 2-4 % لتطهير الجلد والأغشية المخاطية، وهو فعّال ضد الجراثيم إيجابية وسلبية الغرام، ويستخدم ضمن الغسول الفموي ممزوجاً مع مواد أخرى (مركبات لعلاج تراجع اللثة والنزف على سبيل المثال).

❖ **مركبات الفينولات Phenol groups: كانت** تستخدم للتطهير، ولكن سميتها وتأثيرها الكاوي حدّ من استخدمها، أما مركب **(الديتول Dettol)** فيحتوي على الفينول (كإحدى المواد الفعّالة ضمنه)، ويستخدم لتطهير الأرض والأسطح والأثاث.

❖ **المركبات الهالوجينية Halogen groups: وتضم الكلور Chlore وهو المكون الأساسي** لهيبوكلوريت الصوديوم أو ماء جافيل؛ إذ يستخدم للتطهير ضمن المنازل، أو لتطهير سطوح العمل المخبري، وأحواض السباحة، **كما تضم اليود Iodine ذو الخواص المشابهة لكلور، وأهم**

مستحضراته: صبغة اليود، وحاملات اليود Iodophors أو البوفيدون المستخدم للتطهير في المشافي.

- ❖ **بيروكسيد الهيدروجين أو الماء الأوكسيجيني H_2O_2 بتركيز 3 %**: يدخل في محلول تطهير العدسات اللاصقة، وبعض أنواع المناظير الداخلية.
- ❖ **الألدهيدات**: مثل **الفورم ألدهيد Formaldehyde** أو الفورمول أو الفورمالين بتركيز (0.5 – 5 %)، ولا يستخدم على الجلد والأغشية المخاطية، لأنه سام ومخرش للمخاطيات ويسبب التهابات للجلد وحالات أكزما تحسسية. وهناك مركب آخر يدعى **الغلوتر ألدهيد Glutaraldehyde** وهو أكثر فعالية من الفورمول وأقل سمية منه ويستخدم في المشافي للتطهير عالي المستوى أو لتعقيم أدوات التنظير، وأجهزة التنفس والتخدير.
- ❖ **خافضات التوتر السطحي Surfactants: كالصابون والمنظمات** التي تفيد في القضاء على العديد من الجراثيم.

ثانياً: التعقيم

يتم أيضاً باستخدام طرق فيزيائية أو كيميائية:

- **الطرق الفيزيائية:**
  - ❖ **الحرارة Heat:** لتعقيم الأدوات والمواد التي لا تتخرب بها، ولها نوعان: حرارة جافة وحرارة رطبة.

- الحرارة الجافة: تضم:

- **اللهب Flaming أو حرارة الاحمرار Red heat**: لتعقيم الأدوات الجراحية مثل المقصات، أدوات العمل مثل عروة الزرع الجرثومي، عنق الأنابيب الزجاجية، الشرائح الزجاجية.
- **التلهيب بعد الغمس بالكحول (الإيتانول) Flaming after Dipping in Ethanol:** من خلال غمس الأداة في الكحول ثم إشعالها، وتستخدم لتعقيم المشارط والمواد الأخرى التي لا يمكن تسخينها لدرجة الاحمرار، كما يمكن سكب كمية من الكحول على سطح العمل (إذا كان معدني من الستانلس ستيل) ثم إشعاله لتعقيم هذا السطح، وكذلك الأمر لتعقيم الهاون واليد الخاصة به.
- **فرن الهواء الساخن Hot Air Oven**: يعمل بالدرجات (160 C° لمدة ساعتين، أو 170 C° لمدة ساعة، أو 180 C° لمدة نصف ساعة)، ويستخدم لتعقيم الأدوات والأشياء المتحملة للحرارة (أدوات طب الأسنان)، الشكل (1).
- هناك طرق أخرى كالترميد أو الحرق.

الشكل (1): فرن الهواء الساخن Hot Air Oven.

- الحرارة الرطبة:

- **الصاد الموصد أو الأتوكلاف Autoclave:** وهو جهاز التعقيم بالبخار المضغوط؛ إذ يتم تعريض العناصر المراد تعقيمها ضمنه لرطوبة عالية الحرارة، الشكل (2).

العامل المعقم هو بخار الماء المشبع ويتم الحصول عليه بتسخين الماء تحت ضغط عالٍ؛ إذ تزداد درجة غليان الماء كلما زاد الضغط، ويكون البخار المشبع حاملاً لدرجة الحرارة نفسها التي يصل إليها الماء بعد غليانه، حيث تكون درجة الغليان 121 درجة مئوية تحت الضغط 2 bar (2 ضغط جو أو 200 كيلو باسكال kPa) وهنا التعقيم يتطلب من 20-30 دقيقة، بينما تحت الضغط 3 bar تكون درجة الغليان 134 درجة مئوية والتعقيم يتطلب من 3-6 دقيقة.

تستخدم لتعقيم الملابس والشراشف المستخدمة في المخابر والمشافي، وكذلك الأدوات الزجاجية والمعدنية والجراحية والمواد البلاستيكية المتحملة للحرارة، الأوساط الزرعية ما عدا تلك التي تحوي مواد بروتينية لأنها تتخرب بالحرارة العالية.

- **التندلة Tyndallization:** تفيد في القضاء على الجراثيم وأبواغها؛ حيث تتلف إذا تكرر تسخينها عدة مرات وبفواصل زمنية كبيرة، فعند تعريض الأوساط المراد تعقيمها إلى بخار الماء بدرجة حرارة 100 درجة مئوية فإن هذه الحرارة ستقتل الجراثيم ولكن لن تقتل الأبواغ، وعند حضن هذه الأوساط بدرجة الحرارة المزمع العمل عليها لمدة 24 ساعة فإن هذه الأبواغ ستنتش، لذا يتم تعريضها مرة ثانية لبخار الماء بدرجة حرارة 100 درجة مئوية ليتم قتل الجراثيم المنتشة حديثاً، تكرر هذه العملية 3 مرات حتى يتم القضاء على جميع الجراثيم والأبواغ الموجودة.

الشكل (2): الصاد الموصد Autoclave.

- **الاشعاع Radiation**: كأشعة غاما (المتأينة أو المشرّدة Ionizing) المتكونة من أمواج كهرومغناطيسية تنتج بالانشطار النووي (مثل نظير الكوبالت المشع ^{60}Co)، وهي مكلفة وتستخدم على نطاق صناعي لتعقيم الخيوط والأدوات الطبية البلاستيكية والمستحضرات الصيدلانية الحساسة للحرارة، كما يمكن استخدام أشعة بيتا الناتجة عن الالكترونات عالية الطاقة المنتجة بالمسرّعات الالكترونية، بالإضافة إلى إمكانية استخدام الأشعة فوق البنفسجية **قصيرة الموجة** للتعقيم أيضاً.
- **الترشيح (الفلترة) Filtration**: باستخدام المرشحات البيولوجية الغشائية (المسامية) الدقيقة للجراثيم والفطريات (مساماتها أقل من 0.45 ميكرومتر)، وفائقة الدقة (مساماتها أقل من 0.22 ميكرومتر) للفيروسات، وذلك لتعقيم السوائل الحيوية (محاليل الصادات ومنتجات الدم...)، والهواء (غرف العمليات ومعامل الأدوية وغرف العزل الجرثومي).

- **الطرق الكيميائية:**
  - **غاز أكسيد الإيتيلين Ethylene oxide (EtO) gas**: سام وشديد التفاعل وقابل للاشتعال لذا يجب مزجه مع الـ CO_2 وهو مخرش شديد للأغشية المخاطية، يمكن استخدامه من أجل التعقيم بدرجات حرارة منخفضة ($^{\circ}C$ 60-20)، لذا يستخدم لتعقيم الأدوات والمواد (القثاطر والمحاقن البلاستيكية) والأجهزة (أجهزة القلب والرئة الصناعية وغيرها) الحساسة للحرارة، مدة التعرض من 3 إلى 6 ساعات.
  - **الفورم ألدهيد Formaldehyde**: يستخدم بتراكيز عالية لقتل الأبواغ الجرثومية.
  - **المعقمات البلازمية**: البلازما هنا عبارة عن غاز مع بيروكسيد الهيدروجين **Hydrogen peroxide gas plasma**، الذي يعقم بدرجات حرارة منخفضة، ويستخدم للأجهزة الطبية الحساسة للحرارة والرطوبة.

انتهت الجلسة الثانية ... بالتوفيق للجميع

الجلسة العملية الثالثة

الأوساط الزرعية Culture media

الأهداف

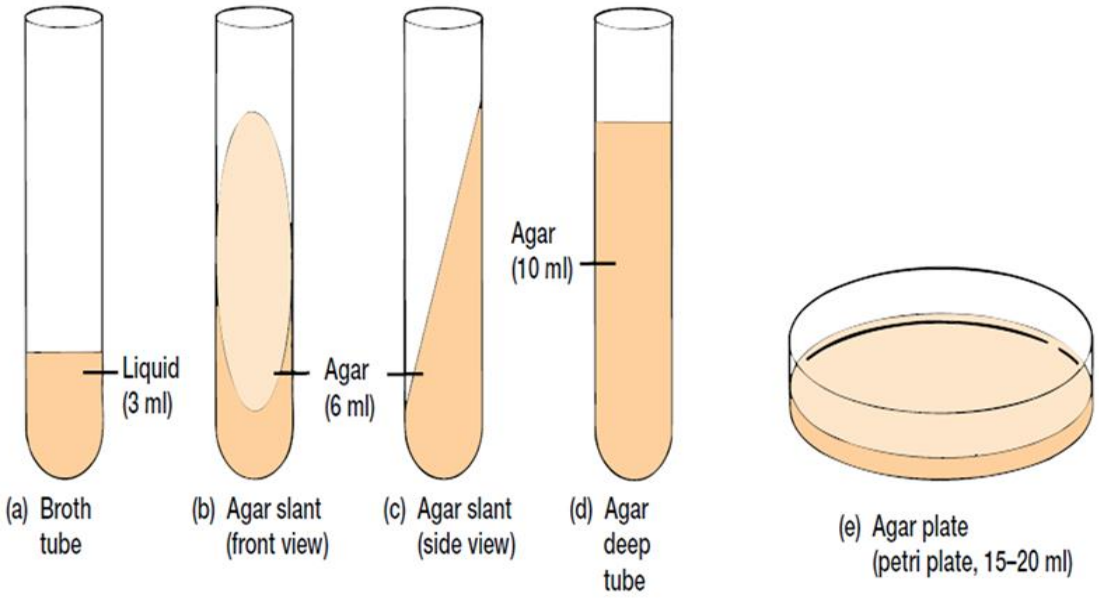
نهدف من هذه الجلسة إلى:

1. التعرّف على عدة أنواع من الأوساط الزرعية الجرثومية المستخدمة.
2. تحضير آغار مولر-هنتون (MUELLER-HINTON-Agar)، وآغار ايوزين-زرقة الميتلين (EMB).

المحتوى العلمي

يعرّف الوسط الزرعي بأنه بيئة مغذية تركيبية صنعية، تحضّر مخبرياً، وتحتوي على الاحتياجات الضرورية واللازمة لنمو وتكاثر الخلية الجرثومية، كالماء، ومصادر للعناصر الكيميائية (خاصة: الكربون، والنتروجين)، والأملاح المعدنية. والمواد العضوية كمصادر للطاقة، ومواد مساعدة للنمو، ومواد موقية أو دارئة buffers للمحافظة على pH الوسط (القريب من التعادل).

تصنّف الأوساط الزرعية حسب قوامها (شكلها الفيزيائي) إلى: السائلة، ونصف الصلبة، والصلبة الشكل (1)، والاختلاف الرئيس بينها هو احتوائها أو عدم احتوائها على العامل المصلّب وهو الآغار آغار.



الشكل (1): الأشكال المختلفة للوسط الزرعي مع أحجامها.

- **الأوساط الصلبة Solid media**

تحتوي على الآغار آغار Agar بنسبة 2%، الذي يجعل الوسط جامداً وصلباً، تنمو الجراثيم على هذه الأوساط بشكل مستعمرات Colonies، تستخدم من أجل الحصول على عزلات نقية للجراثيم، أو حفظ المزارع الجرثومية، أو دراسة شكل ومظاهر المستعمرة الجرثومية، يمكن أن تصب ضمن أطباق بتري أو أنابيب اختبار زجاجية توضع بشكل مائل.

مثال: **الآغار المغذي Nutrient Agar، والآغار المدمى (Blood agar)، وآغار ايوزين-زرقة الميتلين (EMB)، وآغار مولر-هنتون (MUELLER-HINTON-Agar)**، الشكل (2).

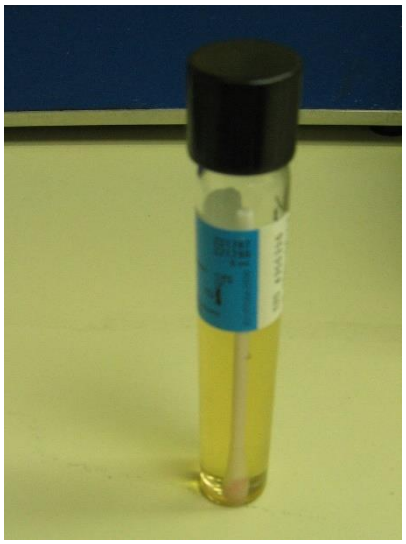
الشكل (2): وسط مولر-هنتون الصلب.

- **الأوساط نصف (شبه) الصلبة Semi-solid media**

تحتوي على الآغار آغار بنسبة 1%، الذي يجعل الوسط نصف صلب (هلامي)، وتستخدم في دراسة حركة الجراثيم، ودراسات التخمّر، والنمو اللاهوائي للجراثيم، وتصب ضمن أنابيب اختبار زجاجية.

مثال:

- **وسط SIM (sulfide, indole, motility):** يدرس الجراثيم من حيث قدرتها على إرجاع الكبريت، إنتاج الأندول، الحركة.
- **وسط ثيوغليكولات Thioglycolate broth**: يستخدم كوسط لنقل العينات، الشكل (3).

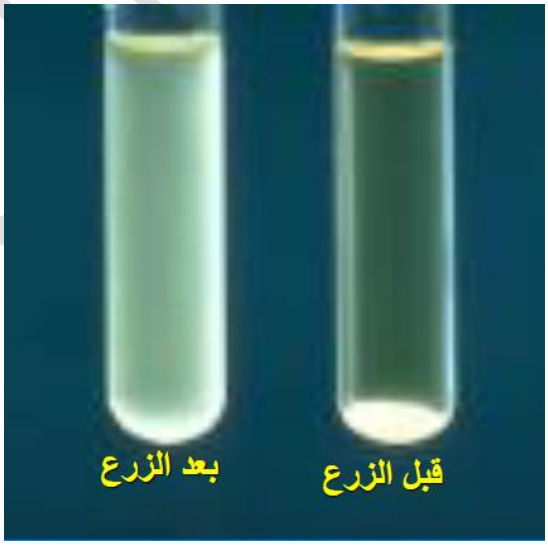


الشكل (3): وسط ثيوغليكولات نصف الصلب (الهلامي).

- **الأوساط السائلة أو المرق Liquid media or Broth**

لا تحتوي على الآغار آغار، يؤدي نمو الجراثيم في هذه الأوساط إلى تعكّرها، فهي تستخدم لتنمية الجراثيم ومضاعفة أعدادها بشكل كبير جداً، بالإضافة إلى العديد من الاختبارات الكيميائية الحيوية للجراثيم.

مثال: **وسط المرق المغذي Nutrient broth**، الشكل (4).



الشكل (4): وسط المرق المغذي السائل قبل الزرع (صافي)، وبعد الزرع (معكّر).

تصنّف الأوساط الزرعية حسب وظيفتها أو الغرض منها إلى:

- **الأوساط العامة General media (أو البسيطة Simple)**

تحتوي المواد الرئيسة (مواد عضوية ولا عضوية) الضرورية لنمو الجراثيم وتكاثرها، ولا تحتوي على أية مواد مثبطة.
مثال: **الآغار المغذّي، المرق المغذّي، آغار مولر-هنتون.**

- **الأوساط الغنية Enrichment media**

غنية بمتطلبات نمو الجراثيم، مع مواد مغذّية إضافية خاصة، منها:

❖ **الآغار المدمّى:** يحتوي على الدم منزوع الليفين بنسبة % 10 – 5، يحضّر بالتسخين إلى الدرجة 45 - 50 درجة مئوية، بحيث لا تتخرب الكريات الحمراء، يستخدم للتفريق بين الجراثيم الحالة للدم؛ حيث يوجد ثلاثة أنماط لحل الدم: ألفا α (حل جزئي)؛ إذ نرى هالة خضراء رمادية حول المستعمرات كالعقديات الرئوية، بيتا β (حل كامل)؛ إذ نرى هالة شفافة حول المستعمرات كالعقديات المقيحة، غاما γ (لا انحلال) كالعقديات المعوية، الشكل (5).

الشكل (5): الآغار المدمّى، وأنماط حل الدم.

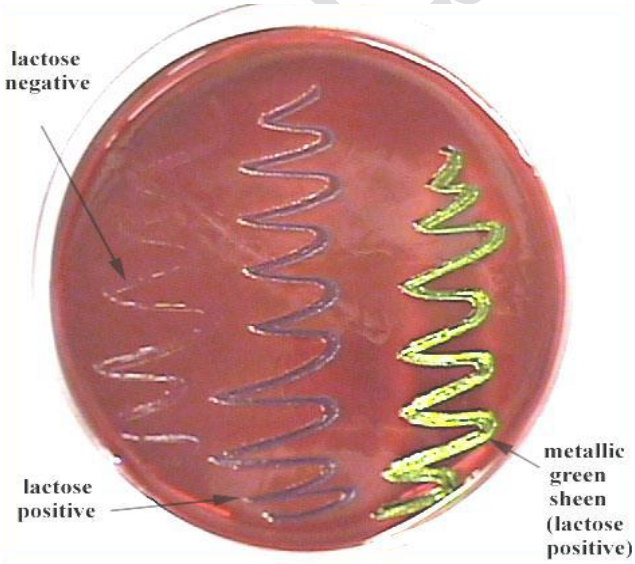
❖ **الآغار الشوكولاتي Chocolate Agar:** كمثال آخر عن الأوساط الغنية، وهو آغار مدمّى يتم تحضيره بالتسخين إلى الدرجة 80 درجة مئوية، مما يسبب انحلال الكريات الحمر فيه، يحتوي على العاملين الخامس (V) والعاشر (X)، الشكل (6).

الشكل (6): الآغار الشوكولاتي.

– **الأوساط الانتقائية (الاصطفائية، الاختيارية) Selective media**

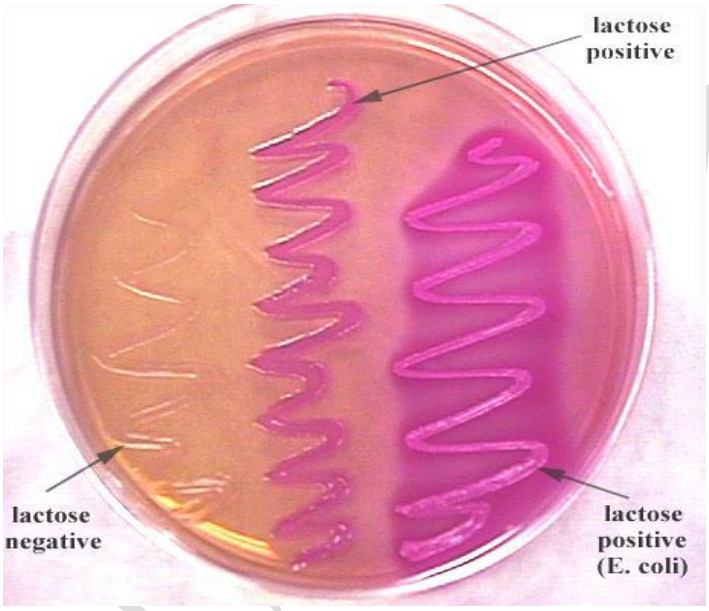
تحتوي على عوامل مثبطة لنمو بعض الأنواع الجرثومية (أصبغة، صادات حيوية، أملاح)، وبالتالي تسمح بنمو مجموعة جرثومية وتثبّط أخرى، ويضاف إليها مواد معينة مثل السكريات والمشعرات اللونية، نذكر من هذه الأوساط:

❖ **آغار ايوزين-زرقة الميتلين:** يحتوي على أزرق المتيلين MB والإيوزين E اللذان يثبطان معظم الجراثيم إيجابية الغرام؛ فهو وسط خاص بالجراثيم سلبية الغرام، كما يحتوي على سكر اللاكتوز (بالإضافة لسكر السكروز) للتفريق بين الجراثيم غير المخمّرة للاكتوز كالعصيات الزرق، والجراثيم المخمّرة له كالعصيات القولونية *E. coli* حيث تظهر المستعمرة بلمعة معدنية خضراء، أو مستعمرة مخاطية بلون زهري *Klebsiella* sp.، الشكل (7).



الشكل (7): آغار ايوزين-زرقة الميتلين، والمستعمرات المخمّرة وغير المخمّرة للاكتوز.

❖ **آغار ماك-كونكي Mac-Conkey agar:** يحتوي على أملاح الصفراء Bile salts، وبنفسجية الكريستال (البلورات البنفسجية) Crystal violet، وهذه المواد تثبط نمو الجراثيم إيجابية الغرام وتسمح بنمو سلبيات الغرام، وهو وسط تفريقي فالجراثيم إيجابية اللاكتوز (المخمّرة) تتلون بالأحمر أو الزهري أما سلبية اللاكتوز (غير المخمّرة) فتكون عديمة اللون أو شفافة، الشكل (8).



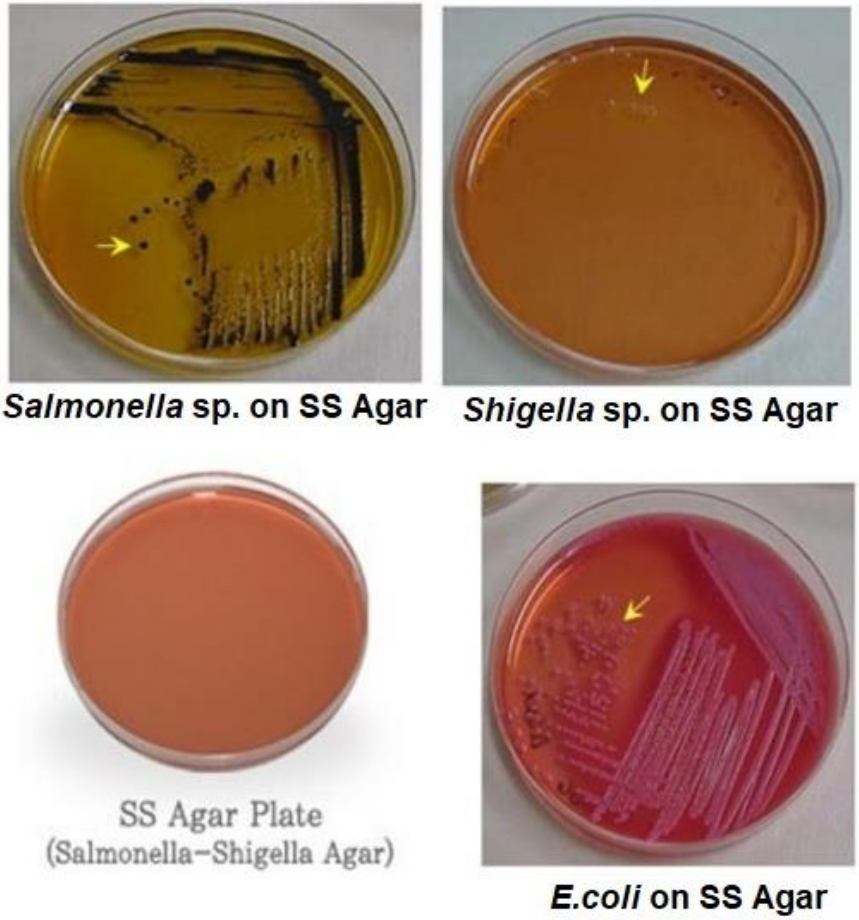
الشكل (8): آغار ماك - كونكي، والمستعمرات المخمّرة وغير المخمّرة للاكتوز.

❖ **آغار المانيتول الملحي (شابمان) Mannitol salt agar (MSA):** يحتوي تركيز مرتفع من ملح كلور الصوديوم يتراوح بين (7.5 -10 %) الذي يمنع نمو معظم أنواع الجراثيم باستثناء العنقوديات، كما يحتوي المانيتول Mannitol (مادة كيميائية تشبه في تركيبها سكر السكروز) مع كاشف (مشعر) حمرة الفينول Phenol red، وهو وسط تفريقي للعنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* تخمّر المانيتول وبالتالي يتحول لون الوسط من الزهري (أو الأحمر) إلى الأصفر، أما باقي العنقوديات فيبقى الوسط باللون الزهري، الشكل (9).

الشكل (9): آغار شابمان، والمستعمرات المخمّرة وغير المخمّرة للمانيتول.

❖ **وسط السالمونيلا والشيغلا Salmonella-Shigella Agar (SS):** يحتوي على أملاح الصفراء، وسترات الصوديوم، والأخضر الفاتح اللماع، التي تثبط نمو الجراثيم إيجابية الغرام ومعظم الجراثيم سلبية الغرام باستثناء السالمونيلا والشيغلا، كما يحتوي هذا الوسط على سكر اللاكتوز، فالجراثيم المخمرة للاكتوز تعطي مستعمرات حمراء تسبب احمرار الوسط مثل *Klebsiella* sp. و *E. coli*، أما الجراثيم سلبية اللاكتوز أي غير المخمرة تعطي مستعمرات عديمة اللون مثل السالمونيلا والشيغلا، كما يحتوي الوسط SS على ثيوسلفات الصوديوم، وسترات الحديد الثلاثي (الحديدك)، لتمييز وتفريق الجراثيم القادرة على إنتاج كبريت الهيدروجين H_2S، وتشكيل راسب أسود مرئي غير قابل للذوبان، تم العثور على هذه الخاصية في بعض سلالات السالمونيلا التي تظهر مستعمراتها مسطحة عديمة اللون مع وجود نقطة سوداء في مركزها، الشكل (10).

يتم استخدام هذا الوسط للتحقق من وجود هذه الجراثيم في عينات البراز، أو في مياه الصرف الصحي، أو في مياه الشرب والطعام.



الشكل (10): آغارSS، ومستعمرات كل من السالمونيلا، والشيغلا، والإشريكية القولونية

- **الأوساط التفريقية (التمييزية) Differential media**

تميز بين الجراثيم من حيث صفاتها الكيميائية، وذلك من خلال إضافة بعض المواد إلى الوسط والتي تستعملها الجراثيم النامية أو تتفاعل معها مما يؤدي لحدوث تغيرات في هذا الوسط فيتم التعرف على النوع الجرثومي.

مثال: **آغار ماك–كونكي، آغار الأيوزين-زرقة الميتيلين، آغار شابمان، آغارSS.**

- **الأوساط الخاصة Specific media**

تستخدم لزراعة نوع محدد من الجراثيم، مثل **آغار لوفنشتاين-جنسن Lowenstien-jensen agar** الخاص بالمتفطرات السلية أو عصيات السل (عصيات كوخ) *Mycobacterium tuberculosis*.

الجانب العملي

تحضير الوسط الزرعي:

1- توزن الكمية المناسبة من مسحوق الوسط الجاهز الجاف حسب التعليمات المثبتة على العبوة، وتوضع ضمن إرلنماير زجاجي (الدورق المخروطي) Erlenmeyer flask.

2- تذاب الكمية السابقة في حجم من الماء المقطّر المحدد في التعليمات، وغالباً ما يكون لتر واحد، وتتم الاذابة إما بالتحريك، أو قد يحتاج الى التسخين.

3- يوضع الإرلنماير في جهاز التعقيم بالبخار الرطب (الأوتوكلاف) لمدة 20 دقيقة، تحت ضغط 2 بار ودرجة الحرارة 121 درجة مئوية.

4- بعد الانتهاء من التعقيم، يتم الانتظار حتى يبرد الوسط إلى الدرجة 40 – 50 درجة مئوية (درجة الحرارة التي تتحملها راحة الكف).

5- يصب الوسط في أطباق بتري، في جو خال من التيار الهوائي على طاولة نظيفة، ومطهّرة، ومعقمة، ومحاطة بلهب مشتعل (يفضّل العمل ضمن غرفة العزل).

6- تحفظ الأطباق في الثلاجة لحين استخدامها.

انتهت الجلسة الثالثة ... بالتوفيق للجميع

الجلسة العملية الرابعة

جمع العينات للفحص الجرثومي

الأهداف

نهدف من هذه الجلسة إلى:

1. تحديد العينات القابلة وغير القابلة للفحص الجرثومي.
2. التعرّف على بعض الأدوات المستخدمة في جمع العينات.
3. التعرّف على بعض الطرائق المتبعة في جمع بعض العينات.

المحتوى العلمي

الشروط الواجب تو افرها في العينة لتكون صالحة للفحص الجرثومي:

1. يجب أن تمثّل العينة العنصر المرضي تمثيلاً جيداً من الناحية الكمية (يجب أن تكون كافية للفحص المباشر والزرع) ، ومن الناحية الكيفية (فمثلاً يجب ألا يكون القشع مخلوط اً باللعاب، كما يجب أن نأخذ العينة من عمق الجرح لا من حوافه وأن نأخذ السائل القيحي لا السائل المدمّى).
2. يجب أن تجمع باستخدام أدوات مناسبة، وأن توضع في عبوات مناسبة، كما يجب أن يكون حجم العبوة مناسباً لنوعية العينة، وأن تكون العبوة نظيفة، ومعقمة، وجافة، ومحكمة الاغلاق، وشفافة لتسهل رؤية العينة، وغير قابلة للكسر، تمتلك لصاقة للبيانات، قابلة للإتلاف، الشكل (1).

الشكل (1): العبوات البلاستيكية المستخدمة لجمع العينات وحفظها.

3. يجب أن تؤخذ العينة من قبل المخبري، أو الطبيب المختص، أو من قبل المريض، بعد إعطائه التوجيهات الضرورية.
4. يكتب على عبوة العينة كل البيانات اللازمة مثل: الاسم، والجنس، والعمر، ونوع العينة، ومكان وجود الآفة، نوع الفحص المطلوب، نوع الصاد الحيوي إذا كان المريض يخضع للعلاج، تاريخ وساعة جمع العينة، هذا

بالإضافة إلى تحذير فيما لو كان يتوقع وجود جرثوم خطير في العينة لكي يتم التعامل معها بحيطة وحذر من قبل المختبر.

5. يجب أن تؤخذ العينة قبل البدء بالمعالجة بالصادات الحيوية، أو بعد 48 - 72 ساعة من إيقاف المعالجة.
6. يجب أن تصل العينة إلى المختبر في وقت أقصاه ساعتين من جمع العينة (أو تحفظ في البراد)، وذلك لأن الجراثيم الطبيعية تتكاثر وتطغى على الجراثيم الممرضة أو قد تكون هذه الجراثيم قابلة للتخرّب، كما أن هناك بعض العينات الجرثومية تستوجب التعامل معها على سرير المريض، أو اللجوء لاستعمال أوساط النقل Transport Media الملائمة.

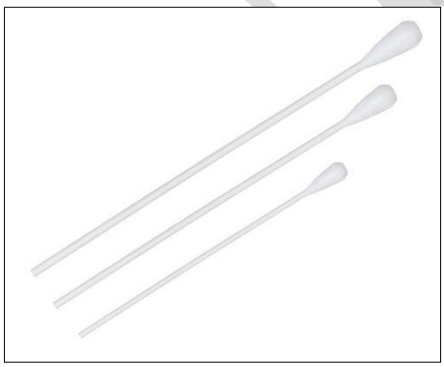
العينات التي يجب رفضها وعدم استقبالها:

1. عينة لا تمتلك البيانات الكافية.
2. عينة بها تسرب.
3. عينة قديمة، أو تأخرت في الوصول إلى المختبر.
4. عينة في عبوة غير نظيفة، أو ليست بالمواصفات المطلوبة.

أدوات جمع العينات:

يشترط بالأدوات المستعملة لجمع العينات الجرثومية العقامة، تختلف الأدوات حسب مكان توضع الآفة ويمكن إجمال الأدوات المستعملة بالآتي:

- **الماسحة swab:** نميّز منها القطنية، وهي عبارة عن عود خشبي (أو بلاستيكي) بنهايته كتلة من القطن، وتختلف أحجام الماسحة بحسب العضو المراد أخذ العينة منه الشكل (2)، تستخدم لأخذ مسحات من الجروح، أو من البلعوم، أو الأنف، أو العين، أو المهبل، أو عنق الرحم، أو الشرج.



الشكل (2): الماسحات القطنية البلاستيكية أو الخشبية بأحجامها المختلفة.

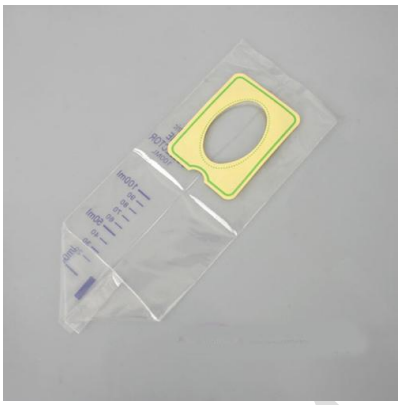
- **المحقن (السيرنغ) syringe:** يستخدم لأخذ عينات من الخراجات (قيح)، أو سائل الجنب، أو سائل الحبن، أو السائل الدماغي الشوكي، أو الدم، الشكل (3).

الشكل (3): المحاقن بأحجامها المختلفة.

- **المشرط والملقط المعقمين:** لأخذ عينات من الأنسجة، وعينات الفطور من الجلد أو الأظافر، الشكل (4).

الشكل (4): المشارط الطبية بأشكالها المختلفة.

- **المنظار:** لأخذ عينات من القصبات (منظار القصبات)، أو من المعدة مثلاً (منظار جهاز الهضم: تنظير علوي) أو من الأمعاء (منظار جهاز الهضم: تنظير سفلي).
- **الأكياس:** مثل أكياس جمع البول عند الأطفال الرضّع، الشكل (5).

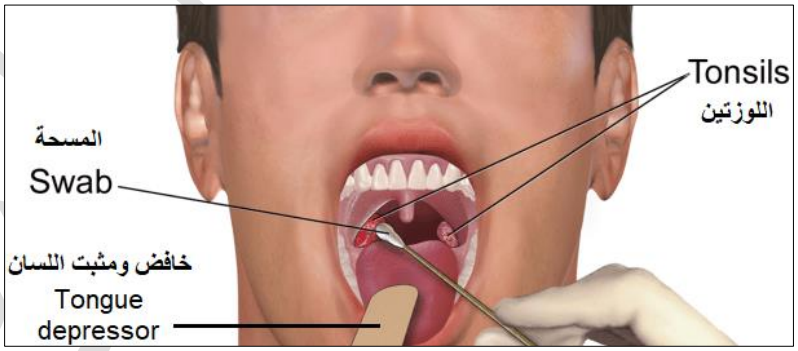


الشكل (5): أكياس جمع البول للأطفال الرضّع.

بعض الطرائق المتبعة في أخذ بعض العينات:

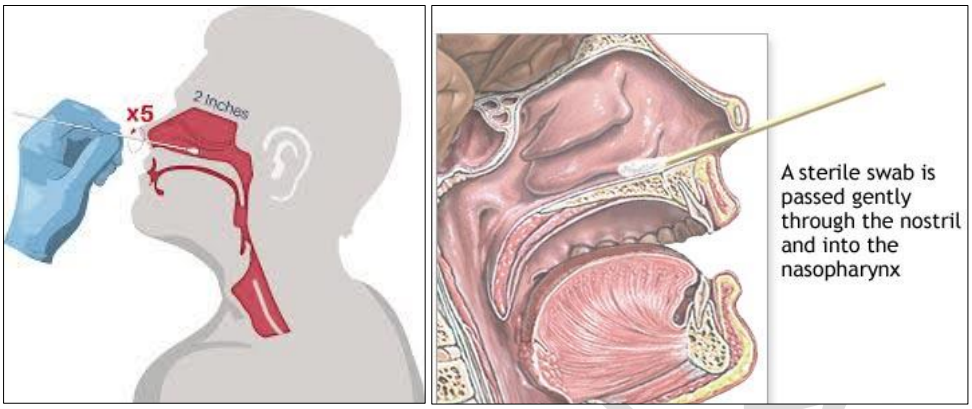
- **مسحة البلعوم الفموية Throat Swab:** تجمع المسحة من البلعوم بالاستعانة بخافض لسان حيث تدخل الماسحة القطنية المعقمة وراءه في المنطقة بين اللوزتين مع الحذر من تنبيه مركز القيء عند المريض أو لمس باطن الخد أو اللسان، وتدور الماسحة فوق مساحة كافية من عمق البلعوم واللوزتين، والمريض في وضعية الجلوس مع رفع عنقه الشكل (6).

تؤخذ هذه المسحة في حالة التهاب البلعوم، أو التهاب اللوزتين، أو السعال الديكي، ويمكن أن يستخدم عدد من الماسحات لأخذ عدة نماذج.



الشكل (6): مسحة البلعوم الفموية.

- **مسحة البلعوم الأنفية Nasopharyngeal:** تؤخذ المسحة من الأنف بإدخال الماسحة في الأنف بعمق 5 سم بزاوية 45 درجة وتحرك على مخاطية الأنف الشكل (7)، تستخدم لتشخيص الفيروسات التنفسية مثل: كوفيد 19 –.

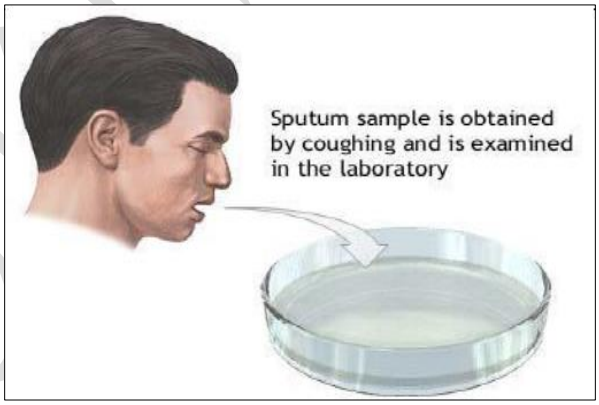


الشكل (7): مسحة البلعوم الأنفية.

- **القشع Sputum (المفرزات القصبية الرئوية):** ويتم بأخذ القشع المندفع بجهد تلقائي (بالسعال)، وأنسب وقت لذلك هو عند الاستيقاظ وقبل تناول أي طعام أو شراب، ويفضل أن يكون بعد تنظيف الفم والأسنان، ويجب ألا يعتمد البتة على القشع اللعابي الصرف. توضع المادة في وعاء عقيم وترسل مباشرة للمختبر، الشكل (8).

يجمع القشع في حالات التهاب القصبات، التهاب الرئة، السل الرئوي أو الفطور الرئوية.

في حال عدم قدرة المريض على التقشّع يستخدم الطبيب منظار القصبات Bronchoscope لأخذ عينة من القصبات مباشرة.



الشكل (8): القشع المندفع بالسعال والموضع ضمن طبق بتري يحوي وسط الزرع المناسب.

الجانب العملي

- **التعرّف على بعض أدوات جمع العينات الموجودة في المختبر.**
- **انتشار الجراثيم في البيئة المحيطة:**

بعد صب الوسط المغذي المحضّر والمعقّم مسبقاً ضمن أطباق بتري:

1- عرّض أحد الأطباق للهواء الجوي داخل المختبر لمدة ساعة، ثم غطّه.
2- المس بإصبعك سطح الوسط الزرعي ضمن طبق ثان (البصمة)، بشرط ألا يتخرب الآغار، ثم غطّه.
3- كرر العملية السابقة ضمن طبق ثالث ولكن بعد غسل الإصبع بالماء والصابون.
4- كرر العملية السابقة باستخدام فرشاة أسنان في طبق رابع، والاسفنجة الخاصة بتنظيف الأواني في طبق خامس، والممسحة الخاصة بتنظيف الأسطح في طبق سادس.
5- خذ باستخدام ماسحة قطنية معقمة مسحة بين الأسنان أو باطن الخد (تجويف الفم)، وازرعها في طبق سابع بشكل خط متعرج (Zigzag).
6- كرر العملية السابقة وخذ مسحة بلعوم فموية ضمن طبق ثامن.
7- قم بتقريب طبق تاسع من الفم، ثم افتح الغطاء قليلاً، بعدها خذ نفس عميق يليه سعال (كحة)، واغلق الطبق.

احضن الأطباق السابقة بالإضافة إلى الطبق الشاهد بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 48 – 72 ساعة، ثم شاهد الأطباق ودوّن النتائج.

انتهت الجلسة الرابعة ... بالتوفيق للجميع

الجلستان العمليتان (الخامسة + السادسة)

طرائق الزرع الجرثومي Bacterial Culture Methods

خصائص المستعمرات الجرثومية Bacterial Colonies Characteristics

الأهداف

نهدف من هذه الجلسة إلى:

1. التعرّف على طريقة زرع الجراثيم على الأوساط السائلة.
2. التعرّف على طرق (التخطيط، الصب، الفرش) لزرع الجراثيم على الأوساط الصلبة.
3. دراسة أشكال ومظاهر النمو المختلفة للجراثيم على الأوساط المغذية الصلبة (المستعمرات الجرثومية).

المحتوى العلمي

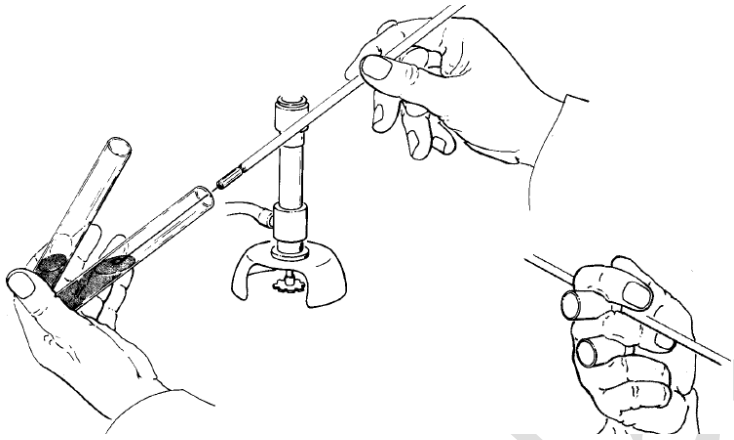
تهدف عملية الزرع الجرثومي إلى تنمية الجراثيم وعزل المستعمرات الجرثومية النقية، بغية حفظها، أو دراستها بإجراء الاختبارات الكيميائية الحيوية المختلفة عليها، أو دراسة خصائصها المورفولوجية، لتصنيفها وتحديد هويتها.

تستعمل عادة الأوساط المغذية الصلبة بغرض الزرع والعزل، ويستعان أحياناً بالأوساط السائلة، ومن أهم الطرق المستخدمة نذكر:

أولاً: الزرع على الأوساط السائلة Inoculating a broth culture

يتم على النحو الآتي، الشكل (1):

1. تعقّم عروة الزرع باللهب، ثم يرج الأنبوب الحاوي على المعلّق الجرثومي وينزع غطاؤه وتعقّم فوهته باللهب.
2. تدخل عروة الزرع فيه، ويؤخذ منه ملء العروة، وتوضع بسرعة في أنبوب الزرع السائل.
3. تعقّم فوهة أنبوب العينة مرة أخرى، ويعاد الغطاء.
4. إذا أردنا أخذ العينة من وسط صلب، نقوم بلمس سطح المستعمرة الجرثومية المراد عزلها بعروة الزرع المعقمة، ثم توضع بسرعة في أنبوب الزرع السائل.
5. بعد تلقيح أنبوب الزرع يحضن في الحاضنة بالدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح من 24 إلى 48 ساعة.



الشكل (1): طريقة الزرع على الأوساط السائلة.

ثانياً: الزرع على الأوساط الصلبة Inoculating a solid media

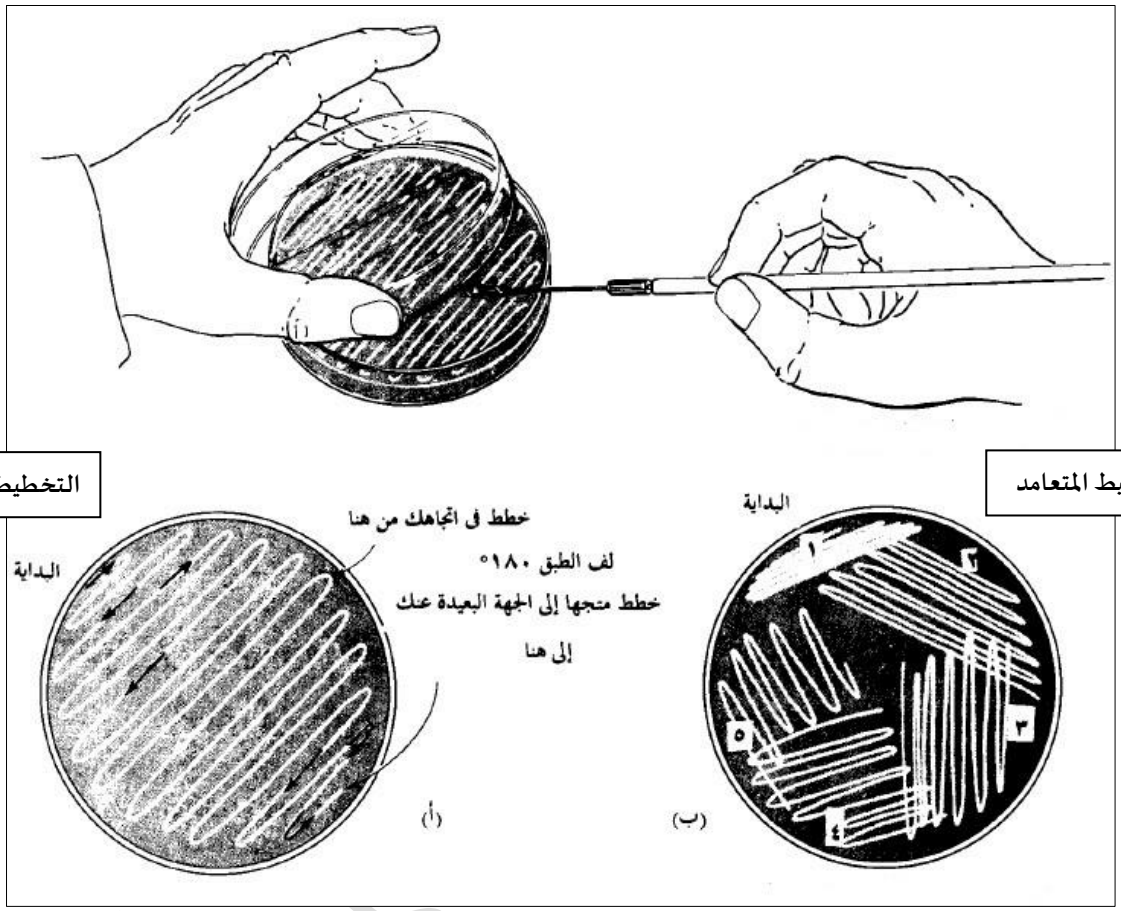
- طريقة التخطيط Streaking an agar plate method

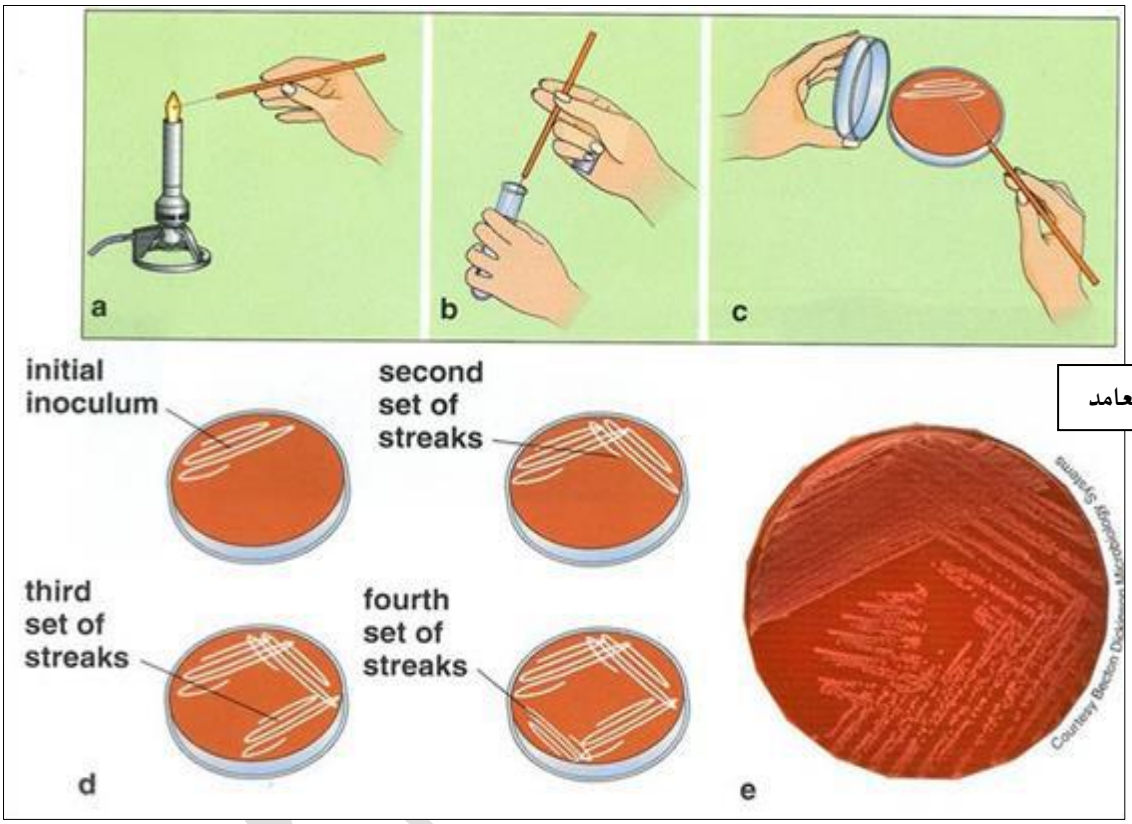
وتضم:

- **التخطيط البسيط**؛ إذ يتم فرش العينة بالعروة المعقّمة على شكل Zigzag ، الشكل (2، أ).
- **التخطيط المتعامد:** وهو الأهم والأكثر استخداماً، ويفيد في الحصول على مستعمرات جرثومية نقية، ومنفصلة، ومتباعدة.

يتم الزرع بالتخطيط المتعامد على النحو الآتي، الشكل (2، ب):

1. تعقّم عروة الزرع باللهب وتترك عدة ثوان لتبرد.
2. يؤخذ ملء العروة من المعلّق الجرثومي أو من سطح المستعمرة، وتوضع على سطح طبق الزرع وتفرش قليلاً، ثم توزع بواسطة العروة بشكل خطوط أفقية لتشمل حوالي ثلث الطبق، ثم يدار الطبق 90 درجة ويتابع الزرع (بعد تعقيم العروة مرة ثانية) بشكل خطوط متقاطعة مع خطوط المرحلة الأولى، يدار الطبق ويكرر الزرع مرة أخرى (أيضاً بعد تعقيم العروة مرة ثالثة).
3. يحضن الطبق (بشكل مقلوب) في الحاضنة بالدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح من 24 إلى 48 ساعة.


التخطيط البسيط
التخطيط المتعامد
البداية
خطط فى اتجاهك من هنا
لف الطبق ١٨٠°
خطط متجها إلى الجهة البعيدة عنك
إلى هنا
(أ)
البداية
(ب)



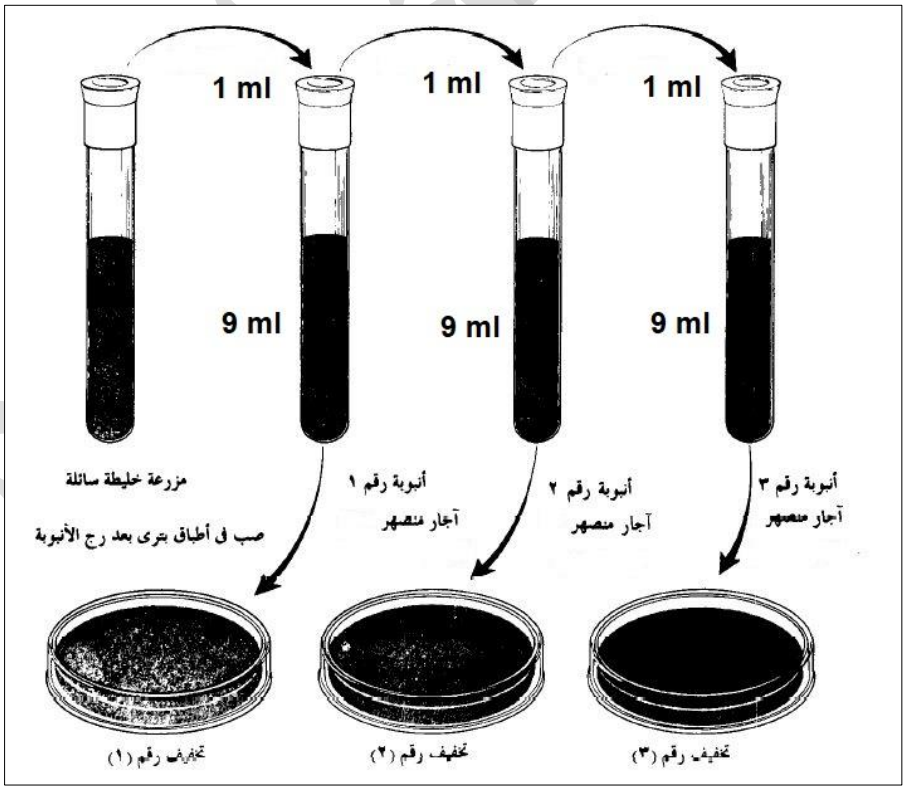
التخطيط المتعامد

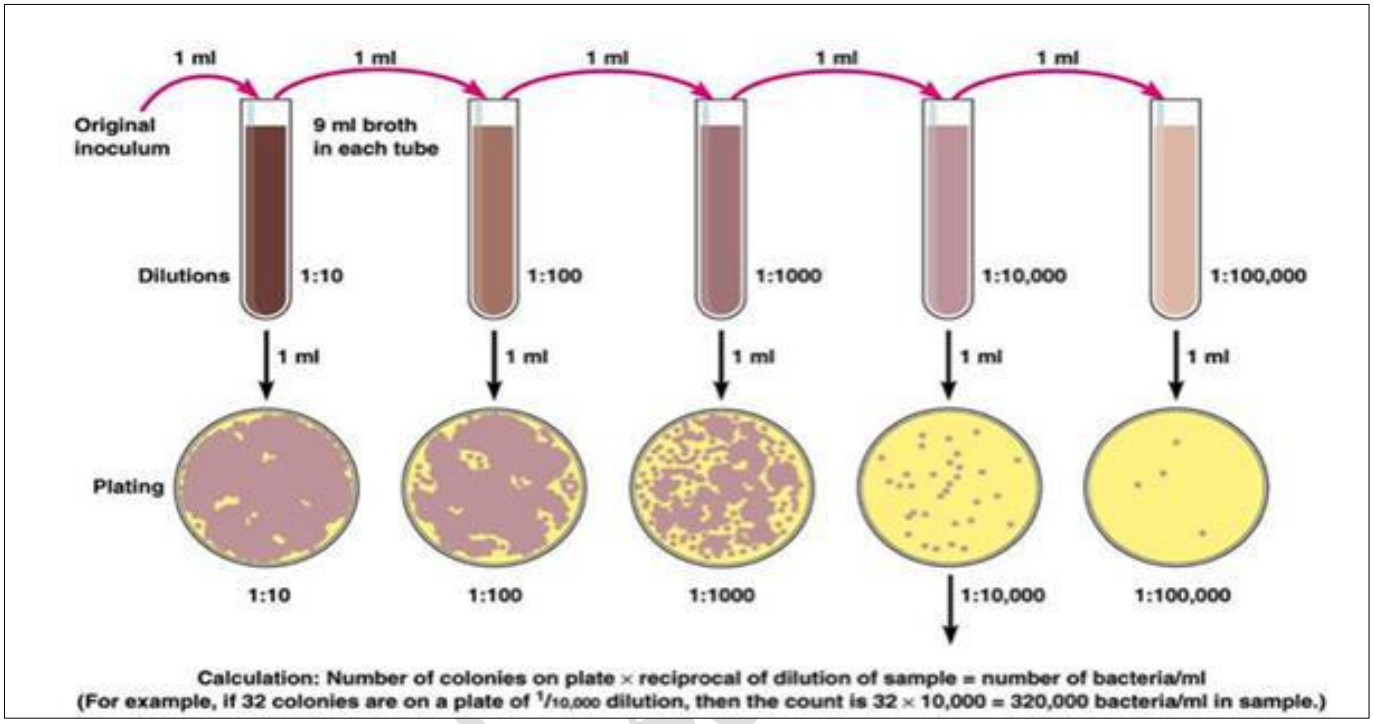
التخطيط المتعامد

الشكل (2): طريقتا التخطيط البسيط والمتعامد.

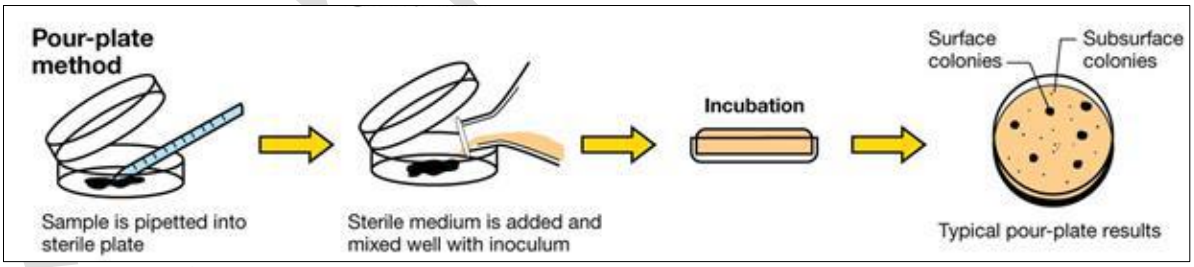
- طريقة الزرع بالصب Pour plate method

1. يتم تجهيز سلسلة معيارية للعينة الأولية السائلة المختلطة (عينة من محلول تربة مثلاً) بطريقة التخفيف المتدرّج Serial Dilution على النحو الآتي، الشكل (3):
   - يؤخذ بماصة معقّمة 1 مل من العينة الجرثومية المختلطة السائلة.
   - تضاف إلى أنبوب الوسط الزرعي السائل (أو المحلول الفيزيولوجي) الحاوي على 9 مل ليصبح التركيز (أو التخفيف) في هذا الأنبوب 10^{-1}، يمزج الأنبوب جيداً ثم يؤخذ منه بماصة أخرى معقّمة 1 مل وتضاف إلى أنبوب ثان جديد حاوي على 9 مل ليصبح التركيز أو التخفيف فيه 10^{-2}، وهكذا بالنسبة للأنبوب الثالث ليصبح التخفيف فيه 10^{-3}.
2. يؤخذ 1 مل بماصة معقّمة من الأنبوب الأول وتضاف إلى طبق بتري فارغ (وكذلك الأمر بالنسبة إلى بقية الأنابيب)، الشكل (4).
3. نصب وسط الآغار المغذي، ونمزج بهدوء بحركة رحوية.
4. ننتظر حتى يتصلب الوسط المغذي، ثم نضع الطبق في الحاضنة (بشكل مقلوب) عند الدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح من 24 إلى 48 ساعة.





الشكل (3): طريقة التخفيف المتدرّج.



الشكل (4): طريقة الزرع بالصب.

يتم حساب عدد الجراثيم على النحو الآتي:

عدد الجراثيم / ml = عدد المستعمرات x مقلوب التخفيف.

فإذا بلغ عدد المستعمرات في التخفيف 10^{-4} (أي التخفيف 1/10.000) 32 مستعمرة.

يكون عدد الجراثيم في الميليلتر الواحد= $32 \times (1/10^{-4}) = 32 \times 10^{4} = 320.000$ جرثومة.

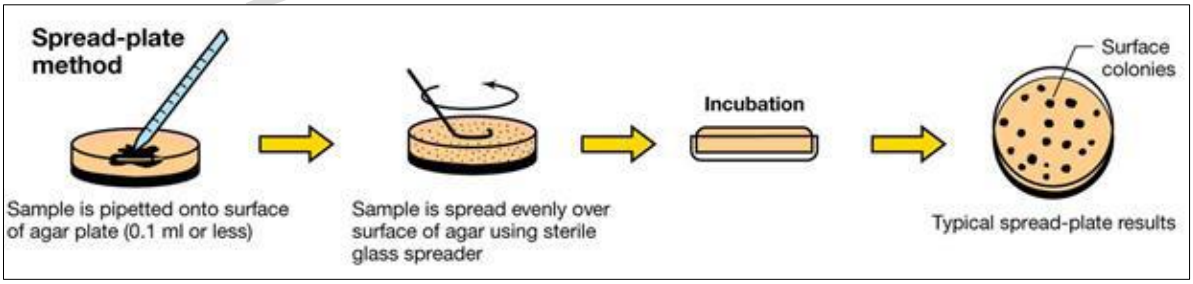
- طريقة الزرع بالفرش Spread plate method

تستخدم هذه الطريقة لإجراء اختبار التحسس للصادات الحيوية، أو عند زرع عينة سائلة (بعدة تخافيف) لعد أو عزل المستعمرات الجرثومية النقية فيها.

- **فرش اختبار التحسس للصادات الحيوية:** تغمر ماسحة قطنية عقيمة في المعلّق الجرثومي عدة مرات، ثم تعصر على حواف الأنبوب، وتفرش بعدها على وسط الآغار المغذي ضمن طبق البتري بدون ترك أي فراغ بثلاثة اتجاهات، الشكل (5).

الشكل (5): طريقة الفرش باستخدام الماسحة القطنية.

- **فرش العزل والعد:** يتم وفق الخطوات الآتية، الشكل (6):
  - يتم تجهيز سلسلة معيارية للعينة الأولية السائلة كما ذكر سابقاً.
  - نأخذ باستعمال الماصة الميكروية (الميكروبيبت Micropipette) 0.1 مل من التخفيف المراد زرعه، ونضعه على سطح الآغار المغذي في طبق البتري.
  - نعقّم الفارشة الزجاجية glass spreader بغمسها بالكحول ثم تلهيبها، ثم نقوم بفرش العينة بحركة دورانية خفيفة.
  - يحضن الطبق (بشكل مقلوب) في الحاضنة بالدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح من 24 إلى 48 ساعة.



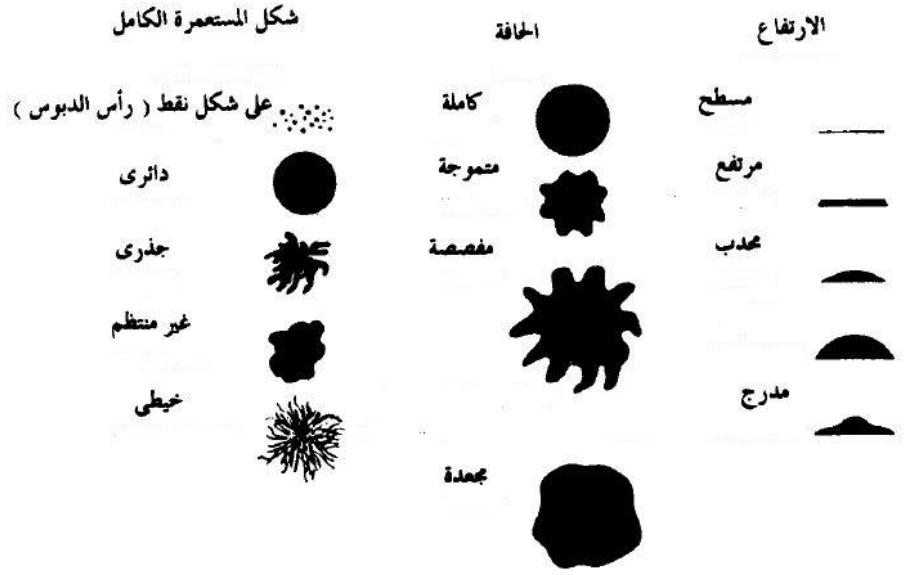
الشكل (6): طريقة الفرش لعزل المستعمرات وعدّها.

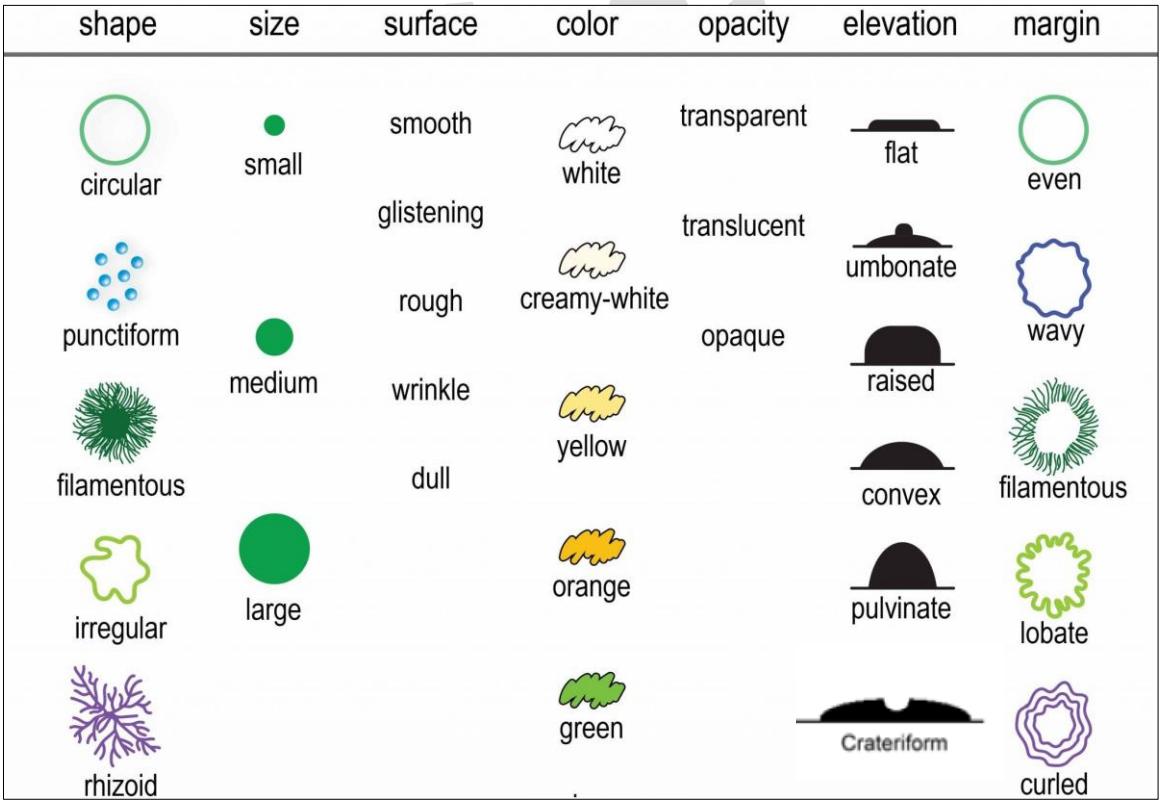
خصائص المزرعة الجرثومية Bacterial Cultural Characteristics

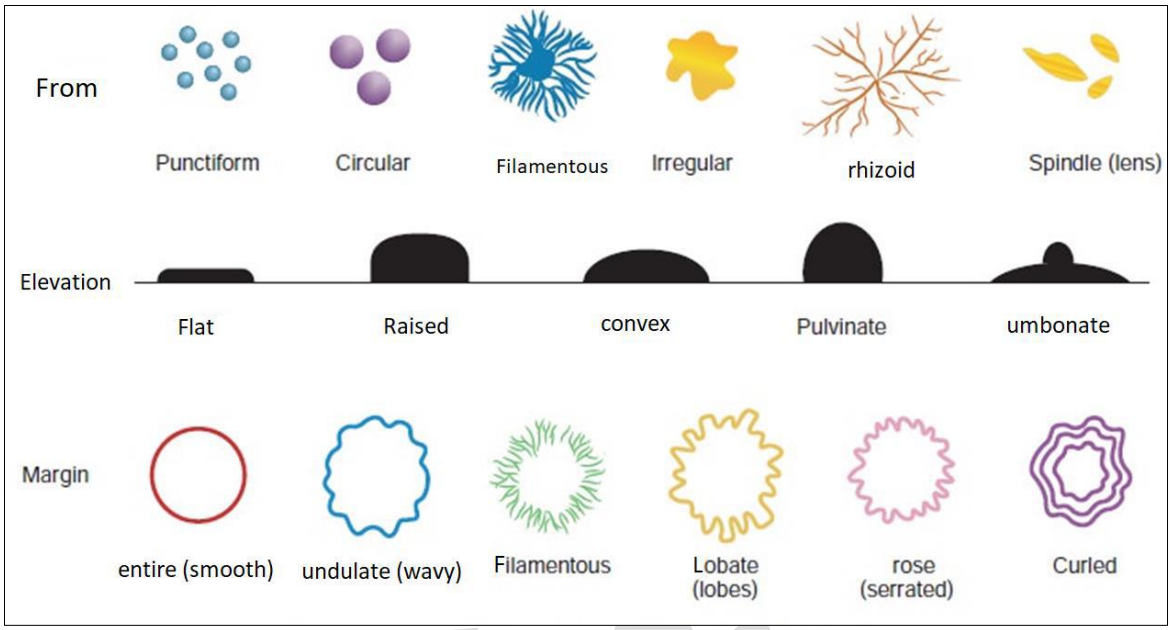
يطلق اسم مستعمرة على مجموعة الخلايا الجرثومية التي تنمو على أو في الوسط المغذي، وتمتلك دراسة الصفات والخصائص المميّزة للمزرعة الشكل (7)، أهمية كبيرة في تمييز وتصنيف الجراثيم، وعلى الرغم من أن الجراثيم كائنات أحادية الخلية إلا أن تجمّعات خلاياها التي تتواجد ضمن المستعمرات النامية تظهر كثيراً من التباين والاختلاف في أشكالها وصفاتها الظاهرية.

يتم فحص المستعمرة بالعين المجردة أو تحت المكبّرة الضوئية، ليتم تحديد:

1. الشكل Form: دائري Circular، نقطي (رأس الدبوس) Punctiform، خيطي Filamentous، غير منتظم Irregular، جذري Rhizoid، مغزلي Spindle.
2. الحافة Edge or Margin: كاملة (ملساء) Entire (Smooth) or even، متموجة Wavy (Undulate)، مفصصه Lobate، مجعدة Curled، مسننة Serrated (شكل الوردة Rose)، خيطية (شُعيرية) Filamentous.
3. الارتفاع Elevation: يحدد بوضع مستوى سطح الوسط المغذي على مستوى النظر، ويكون: مسطح Flat، مرتفع (بارز) Raised، محدب Convex، مدرّج (مع نتوء في المركز) Umbonate، مرتفع مع حفرة في المركز Crateriform، وسادي (شكل الوسادة) Pulvinate.
4. اللون (انتاج الصبغات) Pigmentation: لون المستعمرة (ملونة، غير ملونة)، ولون الوسط الزرعي حولها.
5. القوام أو التماسك Consistency: يمكن التعرف على القوام بوساطة عروة الزرع بعد تمريرها في المستعمرة، وقد يكون: رطب مائي، لزج مخاطي، زبدي، هش، جاف، صلب.
6. الشفافية Transparency أو العتامة (اللاإنفاذية) Opacity: شفافة Transparent، نصف شفافة Translucent، عاتمة (غير شفافة) Opaque.
7. السطح Surface: لامع Glistening، غير لامع (باهت) Dull، ناعم أملس Smooth، خشن Rough، مجعد (متعرج) Wrinkle.
8. الانتشار Spread: يحدد فيما إذا كانت المستعمرة منتشرة على سطح الوسط الزرعي أم محدودة الانتشار.
9. الحجم Size: يقاس قطر المستعمرة باستخدام مسطرة ميلليمتريه من على السطح السفلي لطبق البتري النامية ضمنه، وتصنّف عادة كمستعمرة صغيرة، أو متوسطة، أو كبيرة.
10. الرائحة Odor: عفنة، عطرية، من دون رائحة.
11. التأثير في الدم Hemolytic activity: حالّة للدم Hemolysis من النمط: ألفا Alpha، بيتا Beta، غاما Gamma، أو غير حالّة للدم.


شكل المستعمرة الكامل
على شكل نقط (رأس الدبوس)
دائرى
جذرى
غير منتظم
خيطى
الحافة
كاملة
متموجة
مفصصة
مجعدة
الارتفاع
مسطح
مرتفع
محدب
مدرج


shape
size
surface
color
opacity
elevation
margin
circular
punctiform
filamentous
irregular
rhizoid
small
medium
large
smooth
glistening
rough
wrinkle
dull
white
creamy-white
yellow
orange
green
transparent
translucent
opaque
flat
umbonate
raised
convex
pulvinate
Crateriform
even
wavy
filamentous
lobate
curled



الشكل (7): الخصائص المورفولوجية للمستعمرة الجرثومية.

انتهت الجلسة (الخامسة والسادسة) ... بالتوفيق للجميع

الجلستان العمليتان (السابعة + الثامنة)

الفحص المجهري المباشر Direct microscopic exam

التلوين البسيط Simple Stain

تلوين غرام Gram Stain

الأهداف

نهدف من هذه الجلسة إلى:

1. إجراء الفحص المجهري المباشر بدون تلوين.
2. إجراء التلوين البسيط والتعرّف على الأشكال المختلفة للجراثيم.
3. إجراء تلوين غرام والتفريق بين الجراثيم إيجابية وسلبية الغرام.

المحتوى العلمي

أولاً: الفحص المباشر بدون تلوين (الفحص الرطب Wet exam)

1. نستخدم شريحة زجاجية نظيفة يوضع في منتصفها قطرة صغيرة من المستحلب الجرثومي، ثم يوضع فوقها ساترة نظيفة.
2. تفحص بالعدسة ذات التكبير x 40، ثم بالعدسة الغاطسة x 100.

الغاية من هذا الفحص السريع هو رؤية الجراثيم وعددها وخاصة المتحركة منها ونوع حركتها (حركة براونية أي حركة اهتزازية في المكان، أو حركة حقيقية نشطة سريعة وهادفة تجتاز فيها الخلية الجرثومية الساحة المجهرية)، ولكن من الصعب أخذ فكرة كاملة عن أشكال الجراثيم من خلال هذا الفحص.

إن شفافية الخلايا وحركتها المستمرة تجعل من الصعب دارسة الخلايا الجرثومية بشكل دقيق، لذلك نلجأ الى تلوين (تصبيغ) الجراثيم لتبدو الخلايا بشكل أوضح وبشكل ثابت، يسمح لنا بالفحص المطول لها.

ثانياً: الفحص بعد التلوين

يشترط في أي مادة كيميائية عند استعمالها لغرض صبغ مادة حية أن تتصف بخاصيتين:

- القدرة على التلوين Chromogenic.
- القدرة على التفاعل مع بعض المكونات الخلوية.

إن معظم الصبغات التي تستخدم لدراسة الاحياء المجهرية تعد أملاح من نوعين:

1. **صبغات قاعدية أساسية Basic dye (أملاح قاعدية):** يكون فيها الأيون الحامل للصبغة أو اللون موجب الشحنة Cation، مثال: صباغ أزرق الميتيلين Methylene blue الذي هو عبارة عن كلوريد الميتيلين الأزرق والذي يتفكك إلى الميتيلين الأزرق ذي الشحنة الموجبة $methylene\ blue^{+}$ والكلوريد $chloride^{-}$ ذي الشحنة السالبة، ولون الصبغة هنا يحدده أيون الميتيلين الأزرق.
2. **صبغات حامضية Acidic dye (أملاح حامضية):** يكون فيها الأيون الحامل للصبغة أو اللون سالب الشحنة Anion، مثال: صباغ الإيوزين Eosin الأحمر الذي هو عبارة عن إيوزينات الصوديوم Sodium eosinate التي تتفكك إلى الأيوزينات $Eosinate^{-}$ ذات الشحنة السالبة والصوديوم $Sodium^{+}$ ذي الشحنة الموجبة، ولون الصبغة هنا يحدده أيون الإيوزين الأحمر.

تحمل سطوح الخلايا الجرثومية بشكل عام شحنات سالبة (تحتوي على العديد من المكونات ذات الشحنة السالبة) عندما يكون pH الوسط قريباً من التعادل، وهو الوسط المعتاد غالباً لنمو الجراثيم، لذا تنجذب الخلايا الجرثومية ذات الشحنة السالبة إلى الأيون الموجب الحامل للون في الصبغات القاعدية، وبالتالي تتلون بها، أما الصبغات الحامضية ذات الأيون السالب فتتنافر معها الخلايا الجرثومية ولا تصبغها وإنما تشكل راسباً حولها، وبالتالي الذي يتصبغ هو الخلفية أو الشريحة التي تظهر ملونة (التلوين السلبي).

الهدف من التلوين هو تسهيل رؤية الجراثيم ودراسة أشكالها وصفاتها الخلوية (وجود الأهداب، أو السياط، أو المحفظة، أو الأبواغ)، ومعرفة التنوع الجرثومي ضمن العينة المدروسة، ونسبة كل نوع من الأنواع الموجودة.

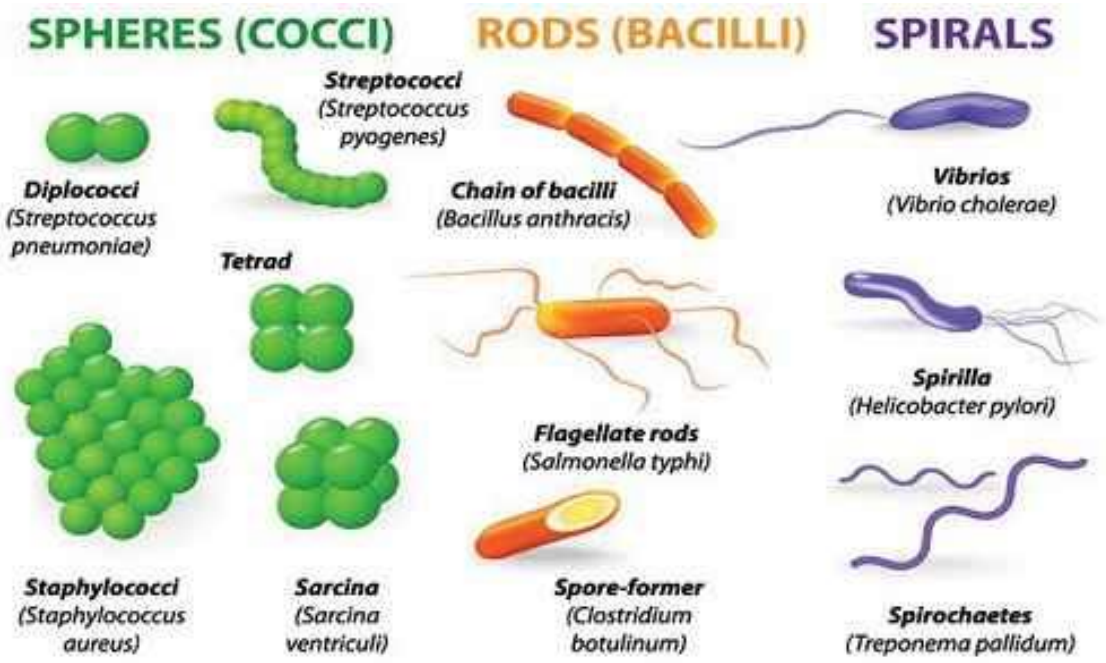
أشكال الجراثيم

يظهر الشكل (1) الأشكال الثلاثة الأساسية للجراثيم وهي:

1. **المكورات Cocci:**
   - العنقوديات Staphylococci (تشبه عنقود العنب).
   - العقديات Streptococci (على شكل سبحي).
   - المكورات المزدوجة Diplococci.
   - المكورات الرباعية Tetraden.
   - المكورات الثمانية الرزمية Sarcina (تشبه المكعب).
2. **العصيات Bacilli:**
   - العصيات المكورة Coccibacilli
   - العصيات المفردة (متطاولة، أو أحد طرفيها أعرض من الطرف الآخر كالعصيات الوتدية)
   - العصيات العقدية أو الخيطية (Chain of bacilli) Streptobacilli (على شكل سلسلة).

3. **الملتويات Spirals:**

- الضمات Vibrios (تكون على شكل حرف الواو، أو مقوسة).
- الحلزونيات Spirilla (لها عدة انحناءات وتموجاتها منتظمة، أو قد تكون على شكل حرف S).
- اللولبيات Spirochaetes (متعددة الانحناءات وشكلها ثابت).



الشكل (1): أشكال الجراثيم.

يمكن تقسيم طرق التلوين إلى التلوين البسيط والتلوين التفريقي:

- **التلوين البسيط Simple Stain**

يستعمل فيه ملون قاعدي (أساسي) وحيد لتلوين الخلايا الجرثومية الشكل (2)، الهدف منه رؤية الخلايا الجرثومية بوضوح من خلال المجهر الضوئي، بالإضافة إلى دراسة الأشكال والأحجام الخاصة بها.

من الملونات المستخدمة: السافرانين أو الفوكسين Safranin or Fuchsin، وبنفسجية الكريستال Crystal violet، وأزرق الميتيلين Methylene blue.

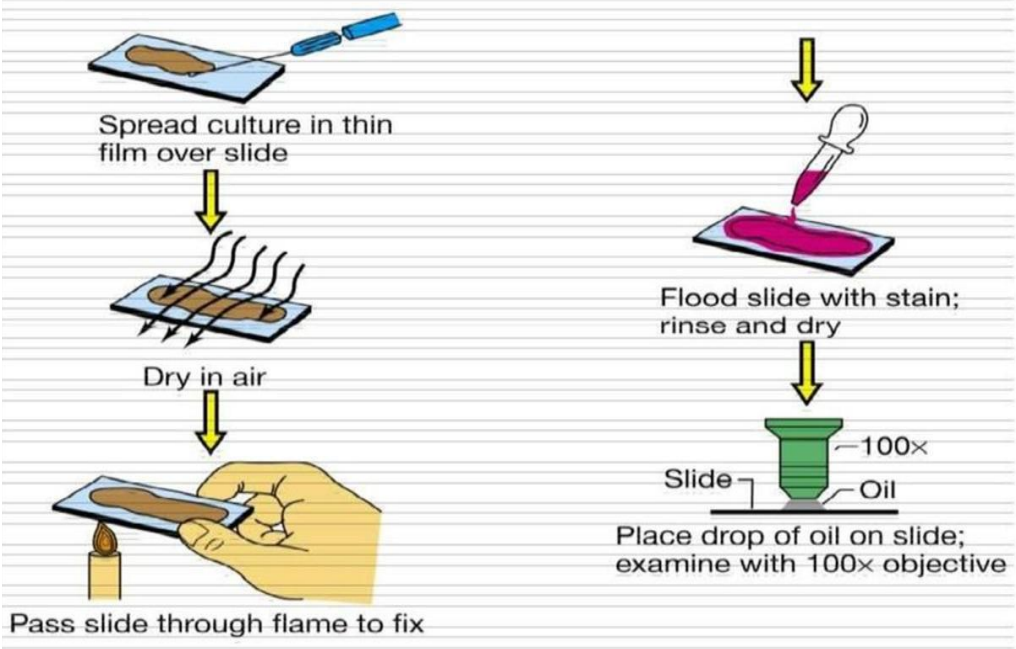
طريقة العمل:

أولاً: تحضير اللطاخة أو المسحة Smear preparation:

1. تعقّم عروة الزرع باللهب وتترك عدة ثوان لتبرد.
2. يؤخذ ملء العروة من المعلّق الجرثومي أو من سطح المستعمرة.
3. تنقل العروة المليئة بالمرق إلى شريحة زجاجية نظيفة وتوزّع بشكل دائري، وفي حال كان المستخدم مستعمرة من وسط الآغار المغذي الصلب فيتم المزج مع نقطة ماء عقيمة على شريحة زجاجية نظيفة.
4. تجفف اللطاخة بالهواء (يجب التأكد من رؤية غشاء رقيق أبيض على الشريحة).
5. تثبّت اللطاخة بالحرارة من خلال تمريرها بسرعة معتدلة على لهب مصباح كحولي 3 مرات؛ إذ يتم قتل الجراثيم ولكن دون تخريب شكلها، كذلك من أجل عدم زوال اللطاخة عند الغسل.
6. نترك الشريحة لتبرد، وعندها يكون المحضر جاهزاً للتلوين.

ثانياً: التلوين البسيط:

1. نضع الشريحة على حوض التلوين.
2. نغمر الشريحة (مكان اللطاخة) بأزرق الميتيلين، أو بنفسجية الكريستال، أو الفوكسين لمدة 1-2 دقيقة.
3. تغسل الشريحة بلطف بالماء المقطر، ويجفف الزائد من الماء على الحواف والأطراف بواسطة ورق ماص (نشّاف) مع الانتباه لعدم مسح مكان اللطاخة الملونة.
4. توضع الساترة ثم قطرة من زيت الأرز، لتفحص باستخدام العدسة الغاطسة ذات التكبير x 100.



الشكل (2): خطوات التلوين البسيط.

❖ التلوين المركّب أو التفريقي Differential Stain

يستعمل فيه أكثر من ملون وعلى عدة مراحل، ومن أمثلته: التلوين المقاوم للحمض، وتلوين غرام.

- **التلوين المقاوم للحمض Acid-fast stain**

يستعمل التلوين المقاوم للحمض أو تلوين زيل نيلسون Ziehl Neelsen لتمييز المتفطرات Mycobacteria كجراثيم مقاومة للحمض Acid-fast bacteria، تمتلك هذه المتفطرات جدار خلوي ذو بنية خاصة (Mycolic acid, Wax) يميزها عن باقي الجراثيم؛ إذ تتلون بصعوبة بأحمر الفوكسين بعد تعريض الشريحة للهب مصباح كحولي عدة مرات، ومتى أخذت الملون احتفظت به؛ حيث لا يمكن إزالته بالحموض القوية، بعدها يطبّق ملون أزرق الميتيلين لتظهر الجراثيم كعصيات حمراء على خلفية زرقاء.

يضم جنس المتفطرات:

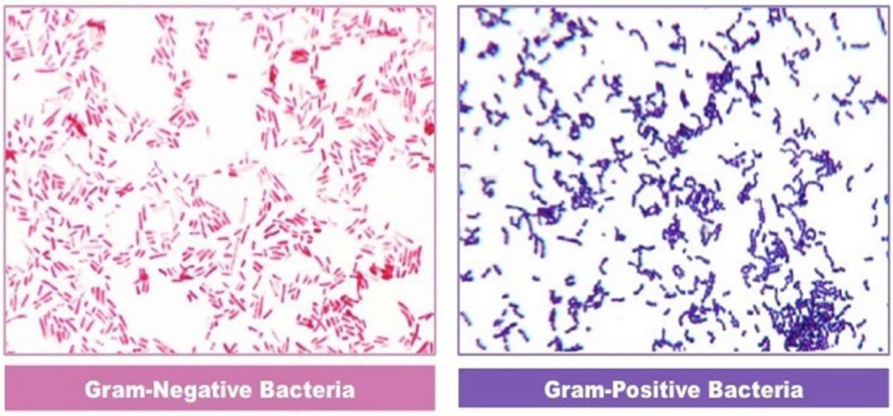
- المتفطرة السلية *Mycobacterium tuberculosis* (عصيات السل أو عصيات كوخ).
- المتفطرة الجذامية *Mycobacterium lepra* (عصيات الجذام).

- **تلوين غرام**

اكتشف الدنماركي Christian Gram عام 1884 طريقة لتلوين الجراثيم باستخدام صبغتين بلونين مختلفين على التوالي، وسميّت هذه الطريقة باسمه.

حيث وجد أن الجراثيم تنقسم إلى مجموعتين، الشكل (3):

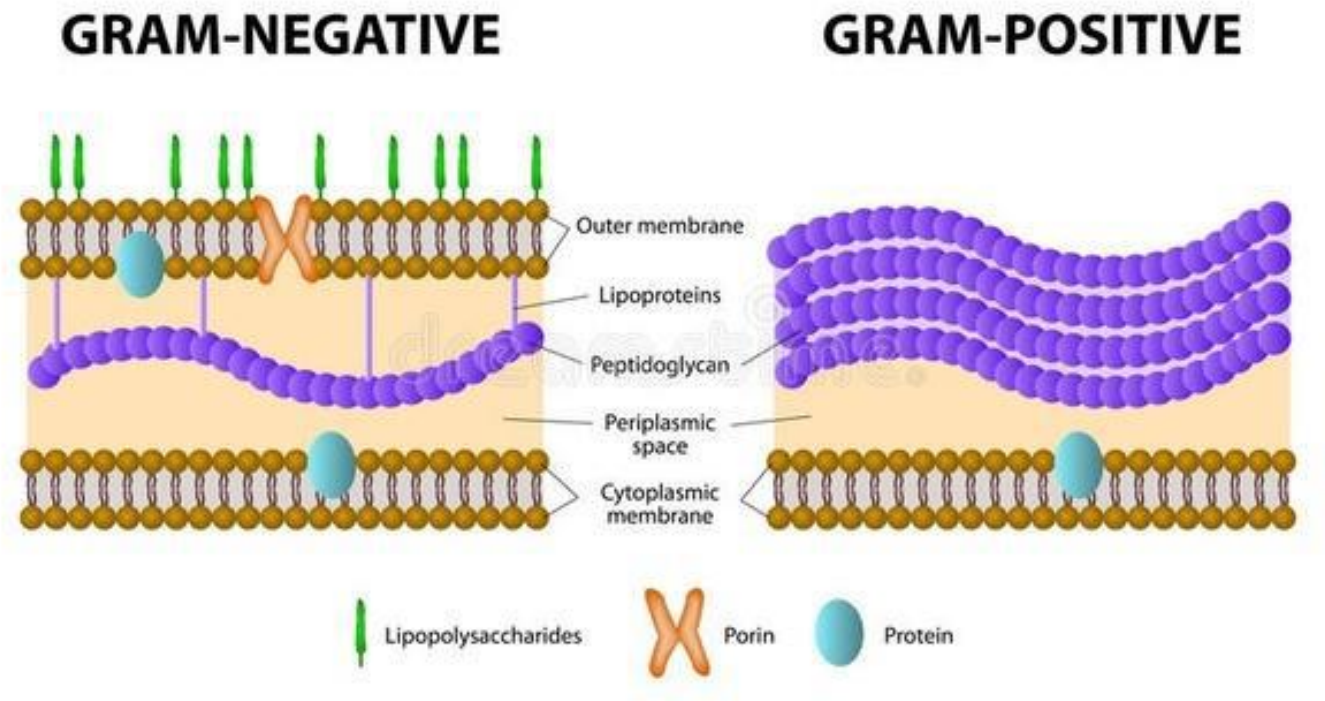
- **الأولى:** تحتفظ بلون الصباغ الأول (بنفسجية الكريستال Crystal violet أو بنفسجية الجانسيان) وتدعى بإيجابيات الغرام +G.
- **الثانية:** تفقد الصباغ الأول عند غسلها بالمحلول المزيل للون، لتأخذ لون الصباغ الثاني وهو السافرانين Safranin (أو كاربول فوكسين Carbol fuchsin، أو الفوكسين القاعدي Basic fuchsin، أو أحمر الفوكسين) وتدعى هذه المجموعة بسلبيات الغرام -G.



الشكل (3): الجراثيم إيجابيات وسلبيات الغرام بعد تلوينها.

مبدأ تلوين غرام

يعود تلوّن الجراثيم إما باللون البنفسجي أو اللون الأحمر إلى تركيب الجدار الخلوي، فهو عند الجراثيم +G أكثر ثخانة (يتألف من طبقة سميكة من الببتيدوغليكان Peptidoglycan) منه عند الجراثيم -G (حيث يتألف من طبقة رقيقة من الببتيدوغليكان يعلوها غشاء خارجي هيولي حاوي على دسم سكري (دسم وسكر متعدد lipopolysaccharide)، الشكل (4).

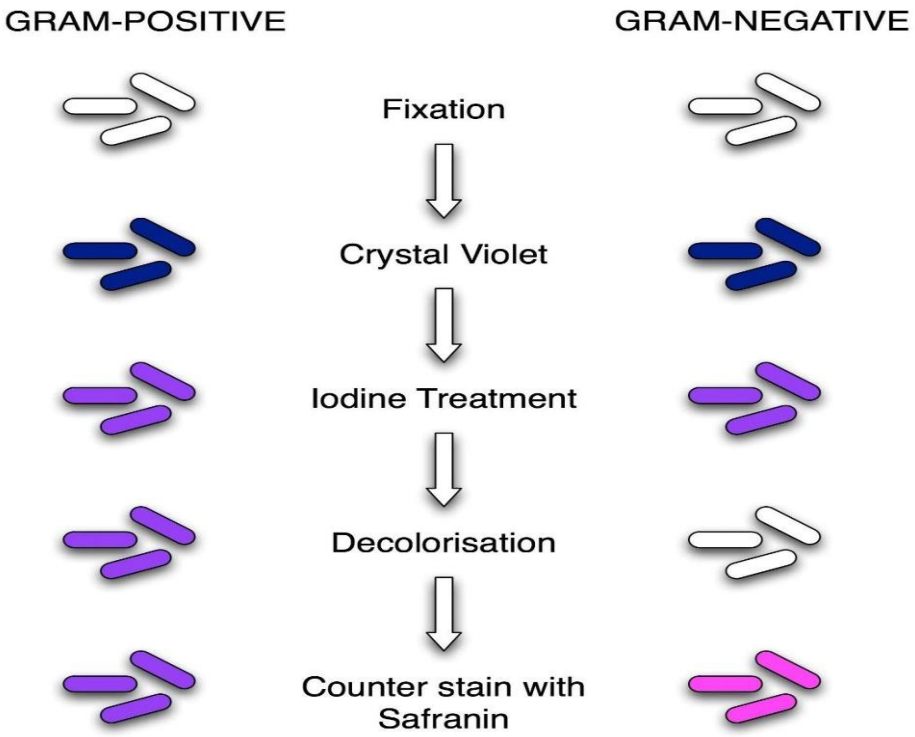


الشكل (4): الجدار الخلوي عند الجراثيم إيجابيات وسلبيات الغرام.

مراحل تلوين غرام

يبّن الشكل (5) مراحل تلوين غرام وهي:

1. عند إضافة الملوّن الأول وهو بنفسجية الكريستال، تصبغ كافة الجراثيم باللون البنفسجي.
2. عند إضافة محلول لوغول، فإن اليود يشكل معقد مع بنفسجية الكريستال يحتجز في طبقات الجدار الخلوي.
3. عند إضافة مزيل اللون، فإنه يذيب الدسم ويخترق الجدار الخلوي الرقيق عند الجراثيم سلبية الغرام ليفكك المعقد السابق وتعود الخلية الجرثومية عديمة اللون، أما عند الإيجابية الغرام فإن مزيل اللون لا يستطيع النفوذ عبر الجدار الخلوي وبالتالي لا يتفكك المعقد وتبقى الجراثيم بلون بنفسجي.
4. عند إضافة الملوّن الثاني وهو أحمر الفوكسين، تتلون الجراثيم سلبية الغرام باللون الأحمر كونها أصبحت عديمة اللون، بينما لا يؤثر هذا الصباغ على الإيجابية الغرام وتبقى بلون بنفسجي.



الشكل (5): مراحل تلوين غرام.

طريقة العمل:

أولاً: تحضير اللطاخة أو المسحة (كما ذكر سابقاً).

ثانياً: تلوين غرام:

1. تغمر الشريحة بملوّن بنفسجية الكريستال لمدة دقيقة (الزمن يختلف حسب كمية الملون).
2. تغسل بالماء المقطر.
3. تغمر الشريحة بمحلول اللوغول (اليود المثبت) لمدة دقيقة واحدة.
4. تغسل بالماء المقطر.
5. يزال اللون باستخدام الكحول 95 % الجاري على الشريحة المحمولة بشكل مائل لمدة 10 إلى 20 ثانية.

ملاحظة: تعتبر هذه الخطوة هي الخطوة الحاسمة والتي يجب الحذر فيها حتى لا يُزال اللون أكثر من اللازم، حيث يمكن للعديد من الجراثيم إيجابية الغرام أن تفقد لونها البنفسجي بسهولة وتبدو كأنها جراثيم سلبية الغرام.

يتم اختيار مزيل اللون المستعمل اعتماداً على السرعة المطلوبة لإنجاز خطوة إزالة اللون، حيث يعد الكحول الإيتيلي 95% أبطأ مزيلات اللون، أما الأسيتون فهو أسرع مزيلات اللون، بينما المزيج المتساوي من الكحول الإيتيلي والأسيتون يعمل بسرعة متوسطة.

6. تغسل بالماء المقطر.
7. تغمر الشريحة بملوّن أحمر الفوكسين (الملوّن الثاني) لدقيقة واحدة.
8. تغسل بالماء المقطر.
9. يجفف الماء الزائد بلطف بورق نشاف، وتجفف الشريحة بالهواء بشكل كامل قبل فحصها تحت المجهر.
10. توضع الساترة ثم قطرة من زيت الأرز، لتفحص باستخدام العدسة الغاطسة ذات التكبير x 100.

أمثلة عن الجراثيم التي تتلون بطريقة غرام:

إيجابية الغرام:

- المكورات العقدية، والعقديات الرئوية، والمكورات العنقودية.
- عصيات الجمرة الخبيثة، وعصيات الكزاز، وعصيات الدفتريا.

سلبية الغرام:

- النايسيريا البنية، والنايسيريا السحائية.
- ضمات الكوليرا أو الهيضة، والزوائف الزنجارية، وعائلة الإمعائيات (كالأيشريكية القولونية، والشيغلا، والبروسيلا، والكليبسيلا، والأنتيروباكتر).

أخطاء التلوين

سلبي غرام كاذب:

- عندما نطيل فترة مزيل اللون، فيبدو اللون البنفسجي للجراثيم +G فاتح أقرب إلى الزهري.
- عندما نقصر فترة بنفسجية الكريستال.
- إذا كانت المستعمرة قديمة بسبب تخرب جدارها الخلوي.

إيجابي غرام كاذب:

- عندما نطيل فترة بنفسجية الكريستال، فتبدو الجراثيم -G بلون بنفسجي.
- عندما نقصر فترة مزيل اللون.

انتهت الجلسة (السابعة والثامنة) ... بالتوفيق للجميع

الجلستان العمليتان (التاسعة + العاشرة)

اختبار التحسس للصادات الحيوية Antibiotic Susceptibility Test

الاختبارات المصلية Serological Test

الأهداف

نهدف من هذه الجلسة إلى:

1. إجراء اختبار التحسس للصادات الحيوية بطريقة الانتشار على الغراء.
2. التعرّف على أهمية إجراء اختبار التحسس للصادات الحيوية.
3. التعرّف على مبدأ الاختبارات المناعية المصلية.
4. إجراء اختبار مصلي للبروتين الارتكاسي أو المتفاعل CRP.

المحتوى العلمي

❖ اختبار التحسس للصادات الحيوية

لا يمكننا عند البدء بعلاج الجراثيم، اختيار الصاد الحيوي بالاعتماد فقط على معرفتنا النظرية لطيف تأثيرها، وذلك بسبب ظهور سلالات جرثومية مقاومة لهذه الصادات باستمرار، لذا علينا اللجوء إلى المختبر الخاص بالجراثيم من أجل معرفة مدى حساسية الجرثوم المعزول تجاه مختلف أصناف الصادات الحيوية المعروفة، أي إجراء اختبار التحسس للصادات الحيوية، وتحديد التركيز الأصغري المثبط لنمو هذا الجرثوم (MIC) Minimal inhibitory concentration لكل صاد على حده.

يجرى هذا الاختبار بطريقة الانتشار على الغراء Disk diffusion method، أو بطريقة التمديد (التخفيف) Dilution method، أو بطرق آلية.

طريقة الانتشار على الغراء Disk diffusion method

هي الطريقة الأكثر انتشاراً وتطبيقاً، وتعرف بطريقة الأقراص أو Kirby-Bauer method، حيث تعتمد على وضع قرص مشرّب بتركيز معين من صاد ما على سطح وسط مغذي من الآغار مزروع بالجرثوم المراد دراسته.

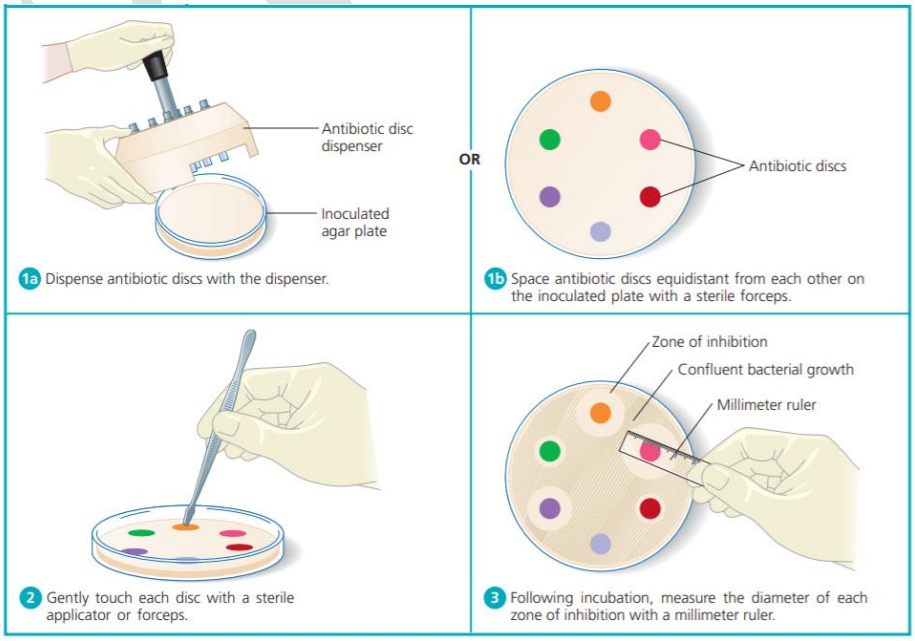
يستعمل عادة لإجراء هذا الاختبار وسط مولر- هنتون Mueller-Hinton agar لأنه وسط عام، ولا يحوي على مركبات مثبطة لنمو الجراثيم، أو مركبات تؤثر على فعالية الصادات، كما يمكن رؤية هالة التثبيط بوضوح من خلاله.

تبعاً لحساسية الجرثوم للصاد أو عدم حساسيته، يلاحظ بعد الحضن ظهور هالة حول الأقراص خالية من أي نمو جرثومي الشكل (1)؛ إذ يتوقف النمو الجرثومي عادة عندما يكون تركيز الصاد يعادل MIC.

الشكل (1): هالات التثبيط حول أقراص الصادات الحيوية.

طريقة العمل:

1. يحضّر المعلّق الجرثومي، بأخذ مستعمرات نقية من الوسط الزرعي عمرها 24 ساعة ثم نقلها إلى سيروم ملحي عقيم.
2. يجب أن يكون المعلّق بدرجة عكارة تعادل 0.5 مكفارلاند McFarland.
3. تغمس ماسحة قطنية عقيمة في المعلّق عدة مرات، ثم تعصر على حواف الأنبوب.
4. تفرش الماسحة على سطح وسط مولر -هنتون بدون ترك أي فراغات، وبثلاثة اتجاهات.
5. توضع أقراص الصادات الحيوية على الوسط باستخدام ملقط معدني معقم باللهب، بحيث تتراوح المسافة بين كل قرص وآخر ما بين 1.5-2 سم على الأقل.
6. يحضن الوسط بوضعية مقلوبة في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 24 - 48 ساعة.
7. تقرأ نتائج الاختبار بقياس قطر هالة التثبيط لكل صاد بالمسطرة مقدراً بالميليمتر، الشكل (2).



الشكل (2): طريقة الأقراص أو Kirby-Bauer method.

أهمية إجراء اختبار التحسس للصادات

1. لا تزال المعالجة بالصادات الحيوية حتى اليوم هي المداواة الأكثر فعالية للأخماج الجرثومية.
2. إن إجراء اختبار التحسس للصادات الحيوية (المتوفرة تجارياً)، يساعد الطبيب المعالج في اختيار الصاد الحيوي الملائم، من حيث طريقة طرحه من الجسم، وكلفته المادية، مع مراعاة حالة المريض الصحية لتجنب الآثار الجانبية والوصول إلى الشفاء التام.
3. إن ظهور السلالات الجرثومية المقاومة يترافق أحياناً مع اكتشاف صادات حيوية جديدة فعّالة تجاه هذه السلالات.
4. تبقى مشكلة السلالات المقاومة للعديد من الصادات الحيوية قائمة، لذلك يجب ترشيد استخدام الصادات الحيوية، وعدم الإفراط في تناولها وبشكل عشوائي، وألا تعطى إلا عند الحاجة إليها، ولفترة زمنية محددة وكافية للمداواة، وبمقادير فعّالة تقضي على السلالات الحساسة وطلائع السلالات المقاومة.

❖ الاختبارات المناعية المصلية

- **مفاهيم وأسس التفاعلات المناعية Immunological Reactions**

– يتمثل المبدأ العام للتفاعلات المناعية في اتحاد (تفاعل) مولد الضد مع الجسم المضاد النوعي الذي تشكّل تجاهه، وتشكيل مركّب (معقّد) مولد لضد – الجسم المضاد. ويمكن الكشف عن هذا المركّب بطرق مختلفة، كالتراص والترسيب وغيرها...

– هناك بعض العوامل التي تلعب دوراً في اتحاد مولد الضد مع الجسم المضاد مثل تأمين الحرارة المناسبة (الدرجة الفضلى هي 37 درجة مئوية)، عامل درجة الحموضة pH، الإنارة، ومدة الحضن. وتستخدم إلى جانب الاختبار تجربة موازية (شاهد)، وذلك للتأكد من دقة العمل وصحة النتائج.

– التفاعلات المناعية هي نوعية جداً، وبشكل عام فإن مولد الضد لا يتفاعل (يتحد) إلا مع الجسم المضاد الذي حرّض على تشكله، أو مولد ضد آخر يشبهه جداً من حيث البنية والتركيب الكيميائي.

– يجب الإشارة إلى أنه من الممكن أن تحدث تفاعلات مناعية متصالبة بين مولدات ضد متقاربة، وهذا يؤدي إلى إعطاء نتائج غير دقيقة تماماً، ويحدّ من فائدة الاختبار، لذا يجب التأكد من أن الأجسام المضادة المتشكلة في جسم شخص ما، فيما اذا كانت ناتجة عن تمنيع الشخص سابقاً، أم هي ناتجة عن المرض في الوقت الحاضر، لأن لذلك أهمية كبرى في تشخيص المرض.

- **بعض طرق (وسائل) الاختبارات المناعية**

- تعد اختبارات التراص أو التلازن Agglutination Testes من أهم الاختبارات المصلية الشائعة لكونها سهلة الاستعمال، ومبدأ هذا التفاعل هو تشكّل كتل أو تجمع يدعى بالتراص أثناء حدوث تفاعل الأجسام المضادة مع مولدات الضد. ومن أجل ذلك يجب أن يكون مولد الضد حبيبياً مثل الجراثيم، أو يجب أن يكون مكوناً من حبيبات خاملة مثل اللاتكس Latex مغلفة بمولدات الضد.
- تستعمل حبيبات اللاتكس كحامل لمولدات الضد وهي عبارة عن مادة البوليسترين تم تصنيعها بشكل كريات صغيرة قطرها حوالي 1 ميكرون، وتتميز بإمكانية تغليفها بمولدات الضد بمقدار كبير، كما تستطيع أن تثبت أجسام مضادة بكميات كبيرة يزيد عددها عن 75000.
- من أنواع اختبارات أو تفاعلات التراص نذكر: التراص المباشر Direct Agglutination ويحدث بشكل مباشر بين مولد الضد والجسم المضاد. أي بدون حامل لمولدات الضد أو استخدام مواد وسيطة، وتعد اختبارات الزمر الدموية مثالاً عن التراص المباشر. أما النوع الثاني فهو التراص غير المباشر Indirect Agglutination وتستعمل فيه حبيبات اللاتكس كحامل وهي تعد خاملة Inert من الوجهة المناعية ولا تقوم بأي تحريض بحد ذاتها على التفاعل المناعي، ويعد اختبار البروتين المتفاعل (CRP) مثالاً عن التراص غير المباشر.
- عوامل (شروط) حدوث التراص:
  - العامل الأول: وجود مولدات الضد وتدعى أيضاً بمولدات الارتصاص Agglutinogen. يجب على مولدات الضد هذه أن تكون قادرة على تشكيل أضداد (أجسام مضادة) أو راصات داخل الجسم تجاهها، وأن تتحد معها لتحدث التفاعل المناعي الذي يدعى بالتراص أو التلازن.
  - العامل الثاني: وجود أجسام مضادة أو أضداد وتدعى أيضاً بالراصات Agglutinin. تتميز هذه الأجسام المضادة بأنها نوعية أي تشكلت تجاه نوع معين ومحدد من مولدات الضد، وتستطيع أن ترص مولد الضد هذا الذي تشكلت تجاهه داخل الجسم.
  - العامل الثالث: وجود سائل فيزيولوجي عقيم (خالٍ من الجراثيم)؛ حيث يضاف هذا السائل بكمية محددة إلى تفاعل الاختبار، وذلك بهدف إزالة الشحنة الكهربائية السالبة التي توجد في الأجسام المضادة ومولدات الضد، والتي يمكن أن تلعب دوراً في تنافر الأجسام المضادة ومولدات الضد وعدم ارتباطها وحدوث التراص بينهما. بناءً عليه فإن السائل الفيزيولوجي يساعد على تعديل الشحنات الكهربائية وبالتالي تقارب مولد الضد والجسم المضاد واتحادهما وحدوث التراص.

- يجب الانتباه إلى نقطتين هامتين عند القيام بالاختبارات المناعية المصلية وهما: حساسية الاختبار Test Sensibility ويقصد بها القدرة على كشف أقل كمية من الأجسام المضادة أو مولدات الضد الموجودة في المصل. أما النقطة الثانية فهي نوعية الاختبار Test Specificity ويقصد بها القدرة على كشف الأجسام المضادة أو مولدات الضد النوعية والمحدّدة. أي لا يحدث تصالبات مناعية مع أنواع أخرى من الأجسام المضادة أو مولدات الضد.

بعض من الاختبارات المناعية المصلية الشائعة للكشف عن البروتينات الغريبة:

- **اختبار البروتين المتفاعل أو الارتكاسي Complex Reactive Protein (CRP)**

- يوجد البروتين المتفاعل أو الارتكاسي بكميات قليلة جداً في مصل الإنسان، حيث يصطنع في الكبد، ويزداد عياره (كميته) عند حدوث ارتكاسات والتهابات حادة وأذية خلوية في الجسم. ومثال عن ذلك نذكر: احتشاء عضلة القلب الحاد، بعض الأورام الخبيثة، الذئبة الحمامية المنتشرة، تنخّر الأنسجة، الإصابات الفيروسية، التهاب الكبد الحاد وغيرها....
- هذا الاختبار غير نوعي ولا يشير إلى مرض معين، لكنه يدل على وجود ارتكاس ما في الجسم يجب البحث عنه باختبارات أخرى، حيث ترتفع كمية هذا البروتين بدءاً من الساعات الأولى للمرض ليصل عياره إلى أعلى مستوٍ له في قمة المرض، الشكل (3).

الشكل (3): العدّة الخاصة باختبار الـCRP.

- **اختبار أضداد المكورات العقدية الحالة للدم Anti Streptolysin-O (ASLO or ASO)**

- تنتج جراثيم المكورات العقدية المقيحة من المجموعة A streptococcus hemolytic Group-A الحالّة للدم (حل كلي من النمط بيتا β) مجموعة كبيرة من الذيافين، ويعد الذيفان O أسهلها للقياس، ويستخدم في الاختبار للكشف عن وجود الجراثيم المذكورة.

- يدعى هذا الذيفان ستربتوليزين Streptolysin O، ويتميز بوزن جزيئي مرتفع حوالي 70000 دالتون، وهو غير ثابت بوجود الأوكسجين، وتزداد كميته في الحمى الرثوية الحادة ومضاعفاتها مثل: التهاب شغاف القلب الحاد، والتهاب الكلية الحاد.
- بما أن هذا الذيفان عبارة عن مادة بروتينية تخصصت لتصبح ذيفاناً، لذلك فإنه يشكل مولد للضد له المقدرة على تحفيز الجهاز المناعي في الجسم لتصنيع أجسام مضادة تجاهه تدعى أضداد ستربتوليزين - O Anti Streptolysin-O (ASLO) .
- بناءً عليه فإن الأشخاص المصابون بجراثيم المكورات العقدية المقيحة *Streptococcus Pyogenes* سيحدث لديهم ارتفاع في كمية ASLO، وهذا دليل على الإصابة بالجراثيم المذكورة، وبما أن ارتفاع كمية ASLO يمكن أن يحدث في عدة أمراض، لذلك يعتبر اختبار ALSO غير نوعي في تحديد الإصابة بمرض معين، لكنه مؤشر نوعي يشير إلى الإصابة بجراثيم المكورات العقدية المقيحة، الشكل (4).

الشكل (4): العدّة الخاصة باختبار الـ ASO or ASLO.

- **اختبار العامل الرثواني Rhumatoid Factor (RF)**

- يتضمن العامل الرثواني مجموعة من البروتينات المناعية الغريبة التي يتم إنتاجها في الجسم بسبب خلل مناعي مجهول السبب.
- تصادف هذه البروتينات عند 80% من مرضى التهاب المفاصل الرثواني، حيث يترسب هذا البروتين في المفاصل مسبباً الالتهاب الرثواني، وتظهر هذه الالتهابات مرافقة لآلام في المفاصل بعد مرور حوالي 5-6 أشهر بعد بدء العملية الالتهابية.
- تبين أن بروتينات RF تدخل بتفاعل نوعي وارتباط مع القطعة FC من جزيء الغلوبولين المناعي (الجسم المضاد) IgG وأيضاً مع IgM، وIgA. يؤدي هذا الارتباط إلى تجمع أو تكدُّس (Aggregation) جزيئات IgG،

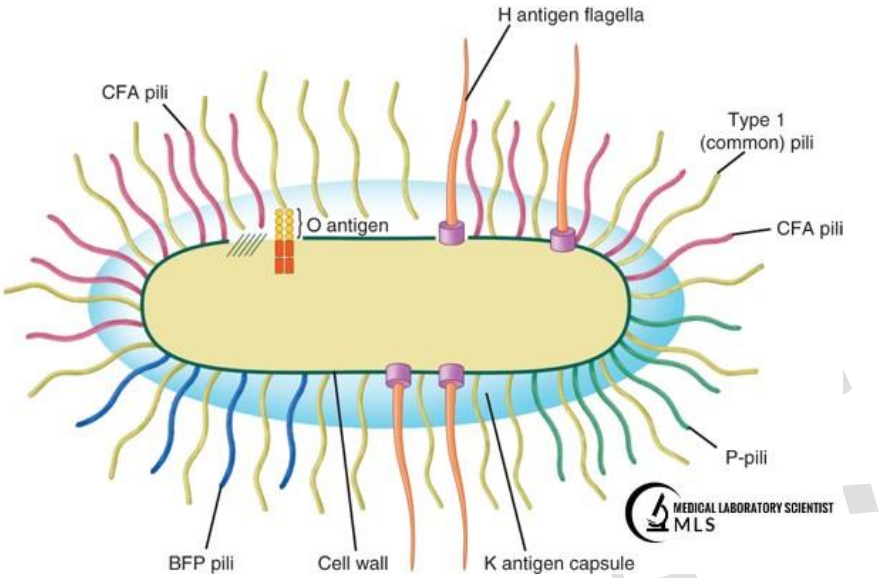
وتسبب هذه التجمعات تنشيط (تفعيل) سبل (طرق) بروتينات المتممة الكلاسيكي والبديل، ونتيجة لتفعيل المتممة تحدث الاستجابة المناعية الالتهابية في المفاصل.

- بيّنت الاختبارات المرافقة وجود العامل الرثواني RF في حالات التهاب الكبد، الذئبة الحمامية، مرض السل، مرض الزهري (السفلس) وغيرها من الأمراض، يختفي عامل RF عندما يتم معالجة هذه الأمراض، لكنه يبقى بشكل دائم في حالة التهاب المفاصل الرثواني.

بعض من الاختبارات المناعية المصلية الشائعة للكشف عن أضداد الجراثيم:

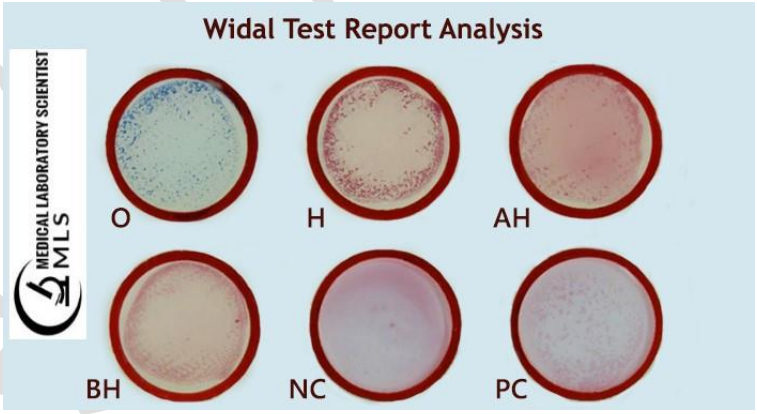
- **اختبار فيدال Widal test**

- يعتمد هذا الاختبار على تفاعلات التراص المباشر، وإظهار الأجسام المضادة تجاه الإصابة بجراثيم السالمونيلا المسببة لمرض حمى التيفوئيد Typhoid Fever.
- هنالك نوعان من الجراثيم يسببان نوعين من الأمراض التيفية. الأول جراثيم *Salmonella typhi* ويسبب الحمى التيفية، والثاني جراثيم *Salmonella paratyphi* ويسبب الحمى نظيرة (شبيهة) التيفية.
- مبدأ تفاعل فيدال: هو الكشف عن الأضداد (الأجسام المضادة) التي يصنعها الجسم تجاه بعض أنواع مولدات الضد الموجودة على سطح الخلية الجرثومية العائدة للسالمونيلا.
- مولدات الضد (المستضدات) الخاصة بالسالمونيلا الشكل (5)، والكشف عنها:
  - بالنسبة للسالمونيلا التيفية يكشف عادة عن الأضداد التي تشكلت تجاه مولد ضد جسمي على الجدار الخلوي O (O- Antigen)، والأضداد التي تشكلت تجاه مولد ضد سوطي H (H- Antigen).
  - أما بالنسبة للسالمونيلا نظيرة التيفية فيتم الكشف عن الأجسام المضادة التي تشكلت تجاه مولد ضد السياط AH (AH- Antigen)، أو تجاه مولد ضد السياط BH (BH- Antigen).
  - كما تمتلك السالمونيلا مولد خاص بالمحفظة Capsule (K- Antigen).



الشكل (5): مولدات الضد الخاصة بالسالمونيلا.

- توجد في الوقت الحاضر مجموعات كواشف تجارية وكل مجموعة تحوي على أربع عبوات، وكل عبوة تحوي على محلول معلق لنوع واحد من مولدات الضد المذكورة أعلاه أي مولدات ضد B، A، H، O، ويمكن إجراء اختبار فيدال بطريقة التراص المباشر الشكل (6)، أو التراص المباشر باستخدام التخفيف المضاعف في سلسلة من الأنابيب.



الشكل (6): طريقة التراص المباشر لاختبار فيدال.

- **اختبار رايت Wright test**

- يدعى أيضاً باختبار البروسيلا Brucella test. ويستخدم هذا الاختبار للكشف عن جراثيم بروسيلا الحمى المالطية (الحمى المتموجة أو حمى البحر الأبيض المتوسط) التي تسببها جراثيم *Brucella melitensis* والكشف عن جراثيم البروسيلا المجهضة التي تسببها *Brucella Abortus*.

- يعتمد اختبار رايت (كما في اختبار فيدال) على مبدأ الكشف عن الأجسام المضادة في مصل المريض التي تبدأ بالظهور بعد الأسبوع الثاني من بدء الإصابة وتصل كميتها إلى الحد الأعظمي بعد مرور ستة أسابيع. وتظهر عادة ثلاثة أنواع من الأجسام المضادة (الغلوبيولينات المناعية) IgM, IgG, IgA ويظهر أولاً النوع IgM ثم IgG. ويبقى IgM لفترة طويلة من الزمن قد تمتد لشهور كثيرة.
- كما في تفاعل فيدال فإنه يوجد طريقتين لاختبار رايت، طريقة التراص المباشر، أو طريقة التراص المباشر باستخدام التخفيف المضاعف في سلسلة من الأنابيب.

الجانب العملي

- **طريقة أو اختبار تراص اللاتكس (الاختبار الكيفي)**

- **أولاً: الكشف على عمل الكاشف الجاهز وعدم انتهاء صلاحيته**

1. نضع 50 ميكرون من الكاشف (اللاتكس) في حقلين من الشريحة البلاستيكية.
2. نضيف للحقل الأول 50 ميكرون من المصل الإيجابي + Control، ونضيف للحقل الثاني 50 ميكرون من المصل السلبي - Control.
3. يتم المزج بعود خشبي أو بلاستيكي، وتحرك الشريحة بشكل دوراني.
4. تترك الشريحة لمدة زمنية من 3 إلى 5 دقائق وتفحص.

نلاحظ حدوث التراص أو التحوصب في الحقل الأول لأنه يحتوي على البروتينات الغريبة، أو الأجسام المضادة، وعدم حدوثه في الحقل الثاني، وهذا يدل على أن الكاشف فعّال لإجراء الاختبارات على مصل المريض.

- **ثانياً: العمل على مصل المريض**

1. نضع 50 ميكرون من المصل في الحقل المخصص من الشريحة البلاستيكية.
2. نضيف فوقها 50 ميكرون من اللاتكس الجاهز، أو قطرة معيارية من المحلول المعلّق.
3. نمزج ونحرك دوارنياً، وتترك الشريحة (3-5) دقائق.

إذا لم يحدث التراص أو التحوصب فالاختبار سلبي والشخص سليم لا يعاني من أية إصابة، أما إذا حدث التحوصب فالاختبار إيجابي والشخص مصاب.

انتهت الجلسة (التاسعة والعاشرة) ... بالتوفيق للجميع