الجامعة السورية الخاصة

كلية الصيدلة

عملي الجراثيم

د. سارة إدريس

جدول المحتويات

قواعد السلامة في المخبر والتخلص من المواد .....

مدخل إلى مخبر علم الجراثيم .....

جمع العينات وتلوين غرام .....

زرع الجراثيم والأوساط الزرعية .....

الاختبارات الكيميائية الحيوية وتحديد هوية الجراثيم 1.....

الاختبارات الكيميائية الحيوية وتحديد هوية الجراثيم 2.....

اختبارات التحسس على الصادات الحيوية.....

تلوين تسيل نلسن Ziel Nelsen stain.....

الاختبارات المصلية.....

تعداد الجراثيم .....

تعليمات تتعلق بالسلامة في المخبر

- يجب ارتداء مريول العملي خلال كامل فترة الجلسة العملية.
- يجب تغطية الجروح، في حال وجودها، قبل بداية الجلسة العملية.
- يُمنع تناول الطعام والشراب ومضغ العلكة وترطيب اللُّصاقات باللُّعاب والجلوس على المقاعد (Benches) خلال الجلسة العملية.
- يجب ربط الشعر الطويل للخلف لتقليل خطر التلوث والحريق.
- يُمنع نقل الأوساط الزرعية والمزارع الجرثومية أو أي من الأجهزة خارج المخبر.
- يجب تجنُّب مصّ (شفط) المزارع الجرثومية السائلة بالفم.
- في حال انسكاب المزارع الجرثومية يجب تغطية المنطقة مباشرةً بأوراق مناسبة ثم إضافة المطهرات المتوفرة.
- عند الدخول للمخبر يجب وضع المعاطف والكتب وأية أغراض شخصية في الأماكن المخصصة وليس على المقاعد (Benches).
- يجب مسح المقاعد بالمطهر المتوفر قبل وبعد الجلسة العملية.
- يجب غسل الأيدي جيداً بالماء والصابون والمطهرات المتوفرة قبل مغادرة المخبر.
- يجب تنظيف مكان العمل بعد انتهاء الجلسة العملية.

التخلص من المواد بعد انتهاء الجلسة العملية

- تُوْضَعُ أطباق بتري في وعاء الصاد الموصد ليُصار إلى تعقيمها قبل التخلص منها.
- تُوْضَعُ الصفائحُ الزجاجية المستعملة والسواتر والماسحات القطنية وغيرها من الأدوات الملوثة الصغيرة في الأوعية البلاستيكية الموجودة على مقاعد العمل (Benches) التي تحوي مطهر (Disinfectant).
- يجب التخلص من الأدوات الزجاجية المكسورة في الأوعية الحمراء المخصصة.
- يجب إبلاغ المشرف عن أي انسكاب أو حادث داخل المخبر.

الجلسة العملية الأولى

مدخل إلى مخبر علم الجراثيم

Introduction to the Bacteriology Laboratory

المواد والأجهزة المستخدمة في العمل داخل المخبر الجرثومي:

الأجهزة: حاضنة، جهاز تعقيم بالحرارة الرطبة (الصاد الموصد...)، جهاز تعقيم بالحرارة الجافة، مجهر ضوئي، ميزان، جهاز تقطير، مصباح بنزن (لهب).

الأدوات: قضيب بلاتين، أوساط زرعية مختلفة، أنابيب اختبار، أطباق بتري، ماسحة قطنية، ممصات.

المواد: الأوساط الزرعية، الملونات، مواد كيميائية (كواشف)، مواد تعقيم (كحول).

دراسة أشكال الجراثيم وتجمعاتها باستخدام المجهر الضوئي:

الجراثيم هي كائنات حية دقيقة وحيدة الخلية بدائيات نواة prokaryotes تتكاثر بالانشطار، ولها ثلاث أشكال رئيسية : مكورات – عصيات – ملتويات، تتراوح أبعدها وسطياً 5 ميكرون تصل أحياناً طول البكتريا المتطاولة إلى 7 ميكرون وأصغرها حوالي 0.3 ميكرون .

1- المكورات Cocci: الجراثيم المكورة يمكن أن تكون مكورة تماماً أو بيضوية تتراوح أبعادها بين 0.5-1µm، وبناءً على مستوى انقسامها والقدرة على البقاء متصلةً مع بعضها البعض يمكن أن تتواجد على أحد التجمعات التالية:

مكورات مفردة cocci

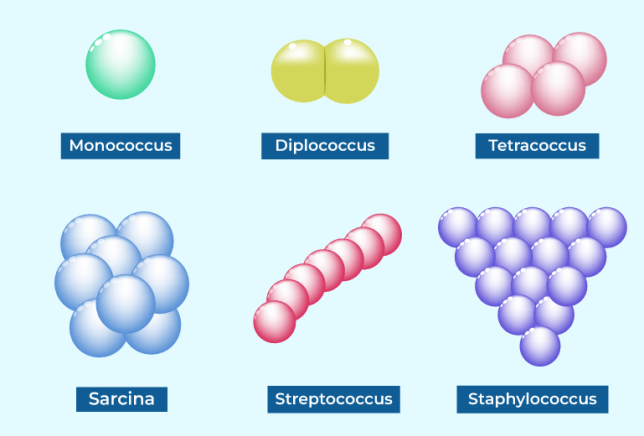
مكورات مزدوجة diplococci

مكورات رباعية tetracocci

مكورات رزمية sarcina

مكورات عقدية streptococci

مكورات عنقودية staphylococii



2- العصيات Bacilli:

تصنف العصيات على حسب نهايتها أو اصطفافها

فهي إما أن تكون :1- ذات نهاية محدبة (مثال: العصيات الكولونية)

2- ذات نهاية مقطوعة (مثال: عصيات الجمرة)

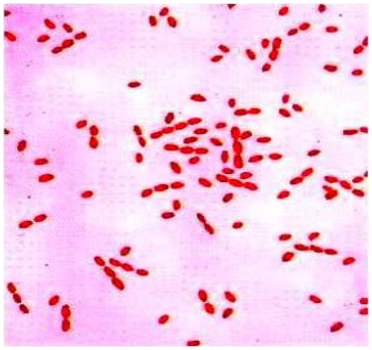
تصنيف العصيات على حسب اصطفافها:

مفردة أو ذات تجمع عشوائي مثال: العصيات الكولونية E.coli.

سلاسل (Streptobacillus) مثال: عصيات الجمرة Bacillus Anthracis.

خطوط متوازية أو خطوط متعامدة تشبه الأحرف الصينية مثال: الوتدية الخناقية corynebacterium Diphteria.

عصيات مكورة (Coccobacillus): غالباً ما تبدو بعض العصيات على شكل عصيات مكورة بعد الانقسام مباشرةً إلا أن الشكل السائد لهذه الجراثيم هو العصوي الكامل مثال: البروسيلا Brucella.



تأخذ العصيات شكل عصوي مستقيم أو منحني قليلا (شكل يشبه الضمة Comma-shaped) مثال: vibrio

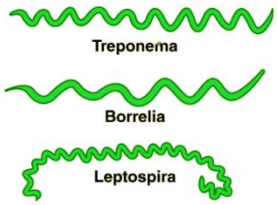
3- الملتويات Spirochete

جراثيم لولبية الشكل وتضم ثلاثة أجناس أو أشكال تختلف فيما بينها بالنهايات وبعدد وانتظام الانحناءات

اللولبيات *Treponema* (انحناءات قليلة العدد منتظمة ذات نهايات مستقيمة)

البورليات *Borrelia* (انحناءات واسعة غير منظمة)

البريميات *Leptospira* (انحناءات كثيرة وأقل عمقا ذات نهايات منحنية)



القسم العملي

المواد والأدوات: مجهر ضوئي، زيت الأرز، محضرات جرثومية مثبتة وملونة.

الفحص المجهري للمحضرات الجرثومية:

يتطلب الفحص المجهري للجراثيم قدرة تكبير عالية وهنا يأتي دور العدسة الغاطسة (X100).

خطوات الفحص المجهري لمحضر جرثومي:

1- استخدام العدسة x10 حتى تظهر لك ساحة المحضر، مستخدماً لولب الإحكام البطيء (coarse focus)، يمكن استخدام العدسة x40 من أجل زيادة التوضيح مع الانتباه إلى استخدام لولب الإحكام السريع (fine focus) هذه المرة.

2- قم بإبعاد العدسة x10 أو x40 ثم ضع قطرة من زيت الأرز على المحضر.

3- قم بوضع العدسة x100 مع الانتباه إلى استخدام لولب الإحكام السريع حتى تظهر الساحة والجراثيم بشكل واضح.

4- بعد الانتهاء من فحص المحضر قم بإزالة زيت الأرز من العدسة بمحارم مناسبة.

الجلسة العملية الثانية

جمع العينات وتلوين غرام

(Clinical Sampling & Gram stain)

هناك طريقتان تستخدمان في التشخيص المخبري للأمراض الجرثومية: الأولى هي التشخيص المباشر أو ما يعرف بالطريقة الجرثومية (Bacteriologic Approach) والتي يتم فيها تحديد هوية الجراثيم عن طريق تلوينها وزرعها، أما الطريقة الثانية فهي التشخيص غير المباشر أو ما يعرف بالطريقة المناعية أو المصلية (Serologic Approach) حيث يتم الكشف عن وجود العامل الممرض عن طريق التحري عن الأضداد المتشكلة تجاهه في مصل المريض.

يجب أن يتم جمع العينة بشكل مناسب، وأن يتم إيصالها إلى المخبر داخل وسط نقل مناسب، وأن تُزرع العينة في وسط يدعم نمو العامل الممرض الأكثر احتمالية.

مراحل العمل في المخبر الجرثومي

- جمع العينات
- فحص مباشر (عبيط) تحت المجهر بعد التلوين لرؤية الجرثوم.
- الحصول على مزرعة نقية للجرثوم بزرعه داخل وسط مناسب لنمو الجراثيم.
- تحديد هوية الجرثوم عن طريق إجراء الاختبارات الكيميائية الحيوية والاختبارات الأخرى.
- إجراء اختبارات التحسس على الصادات الحيوية.

جمع العينات

العينات إما أن تكون:

- من مفرغات الجسم (بول، براز...)
- أو من مفرزات الجسم (قشع، سائل دماغي شوكي، قيح،.....)
- أو عينات نسيجية.

إن جمع العينات يعتبر من الخطوات المهمة في تشخيص الأمراض الجرثومية حيث إن نتائج التشخيص تعتمد على صحة وسلامة أخذ العينة وزرعها على الأوساط الزرعية الملائمة، حيث يؤثر حجم العينة وكمية الجراثيم فيها على كفاءة التلوين والزرع.

بعض الملاحظات الواجب أخذها بعين الاعتبار عند جمع العينات:

- أن تكون العينة مناسبة كماً وكيفاً للفحص (ممثلة لموقع الاصابة)، مع تجنب تلويثها بجراثيم الزمرة الطبيعية.

- استخدام عبوات ملائمة لنوع وحجم العينة، وأن تكون محكمة الاغلاق، شفافة لرؤية العينة، قابلة للإتلاف.
- يجب أن تكتب المعلومات اللازمة على العبوة بما فيها: اسم المريض، تاريخ الميلاد، مصدر العينة، تاريخ ووقت أخذ العينة.....
- تجنب تلويث السطح الخارجي للعبوة وأية أوراق مرافقة للعينة التي يتم جمعها.
- يجب أن يتم أخذ العينة قبل تعاطي الصادات الحيوية، إذا أمكن، أو الانتظار 72 ساعة بعد التوقف عن تناول الصادات الحيوية.
- يجب أن تنقل العينة بأسرع وقت ممكن إلى المخبر، أو توضع في أوساط نقل مناسبة تحقق الشروط لضمان بقاء الجراثيم حية أو وضعها في سائل يمنعها من الجفاف.

الطرائق المتبعة في أخذ بعض العينات

1- مفرزات الطرق التنفسية العليا (الأنف والبلعوم)

تجمع المسحة من البلعوم بالاستعانة بخافض لسان حيث تدخل الماسحة القطنية وراءه في المنطقة بين اللوزتين مع الحذر من تنبيه مركز القيء عند المريض، وتدور الماسحة فوق مساحة كافية من عمق البلعوم، والمريض في وضعية الجلوس مع رفع عنقه. تؤخذ المسحة من الأنف بإدخال الماسحة في الأنف بعمق 2 سم وتحرك على مخاطية الأنف. نلجأ للمسحة الأنفية في حال الشك بوجود جراثيم لا يمكن الوصول إليها بواسطة المسحة الفموية مثل المكورات السحائية.

دراسة زمرة البلعوم الجرثومية الطبيعية Flora:

يولد الطفل عقيماً، وأول جرثوم يتوضع في الفم هو العقديات المخضرة streptococcus viridans خلال 4-12 ساعة من ولادة الأطفال، في الشهر الأول بعد الولادة تبدأ بالتوضع أنواع من العنقوديات الهوائية واللاهوائية ثم العصيات اللبنية Lactobacillus ثم أشباه الدفتريا Diphteriodes ثم النيسريات العاطلة ثم في مرحلة ظهور الأسنان في السنة الأولى من العمر تتوضع الملتويات اللاهوائية Anaerobic Spirochets ويتوضع عند البالغين بالإضافة لما سبق محبات الدم Haemophilus والفطور Fungi.

الزمرة الممرضة أو الملوثة:

- العقديات المقيحة Streptococcus pyogenes
- العنقوديات الذهبية Staphylococcus aureus
- المكورات العقدية الرئوية Streptococcus pneumoniae
- البوردتيديلا الشاهوقية Bordetella pertussis
- الدفتريا الخناقية Dephteria

2- المفرزات القصبية الرئوية:

ويتم أخذ القشع المندفع بجهد تلقائي، وأنسب وقت لذلك هو عند الاستيقاظ وقبل تناول أي طعام أو شراب، ويفضل أن يكون بعد تنظيف الفم واللسان. توضع المادة في وعاء عقيم وترسل مباشرة إلى المختبر.

يعتبر الجهاز التنفسي السفلي بما فيها القصبات والحويصلات الهوائية عقيمة، ووجود جراثيم فيها يدل على انتان جرثومي. يجرى زرع القشع عند الاشتباه بذات الرئة أو السل ومن أهم الجراثيم المسؤولة عن انتانات الجهاز التنفسي السفلي هي:

(M.tuberculosis, corynobacterium diphtheria, Bordetella pertussis, P.aerogenosa)

3- البراز:

توضع عينة البراز في وعاء عقيم ويتم اختيار المخاطي أو المدمى منه إن كان يحوي هذه المواد، وإذا تعذر إجراء الفحص المخبري مباشرة توضع العينة بحرارة +4 لمنع تكاثر الجراثيم . لا تصلح العينة التي سبقها تناول مركبات الباريوم والبزموث أو الملينات الزيتية لتحري الطفيليات وبيوضها، ولا تصلح عينة البراز التي جمعت لغرض جرثومي إذا كان المريض يتناول مضادات حيوية، ويجب التنبيه إلى عدم اختلاط البراز بالبول أو بدم الحيض أو بالإفرازات المهبلية، أو بأي شيء آخر. يجب تحليل العينة ذات القوام الإسهالي خلال فترة لا تزيد عن ساعة من خروجها من الجسم، وإذا تعذر ذلك يجب حفظ العينة بأحد طرق الحفظ المناسبة.

4- البول:

يفضل جمع البول من وسط البيلة الصباحية، مع التنبيه على المريض غسل الأعضاء التناسلية الخارجية جيداً بالماء والصابون قبل أخذ العينة. يجب أن تفحص العينة خلال 2-3 ساعات من جمعها.

5- الدم:

لا يتجاوز عدد الجراثيم الممرضة في عينة الدم عند 50% من المرضى أكثر من 1 جرثوم/مل، لذا فإن حجم عينة الدم المسحوبة مهم جداً. يجرى زرع الدم عند الشك بإنتانات شغاف القلب والسحايا والحمى مجهولة السبب. كما يعتبر وقت جمع العينة أيضاً مهم حيث تقسم حالات تجرثم الدم إلى قسمين مستمرة ومتقطعة. يجب أن يتم زرع عينة الدم مباشرة بعد أخذها إلى أوساط زرعية غنية، ويفضل أن تكون في ذروة ارتفاع حرارة المريض. كما لا يعتبر تلوين غرام مجدياً في فحص عينة الدم.

النمو الجرثومي (Bacterial Growth)

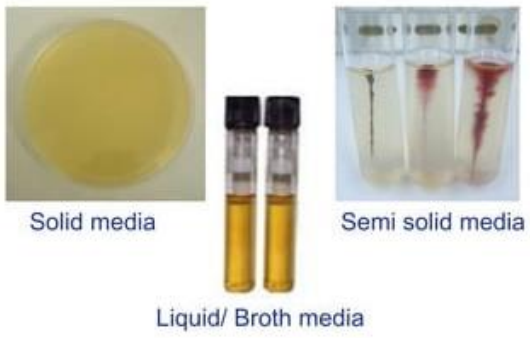
يتطلب النمو الجرثومي وجود مواد مغذية وعوامل نمو متعددة أهمها:

ماء – مصدر للكربون – مصدر للآزوت – نظام وقاء – مصدر للمعادن – ڤيتامينات – عوامل نمو...

عادةً ما يتم زرع الجرثوم في المخبر ضمن أوساط تسمى أوساط الزرع (culture media) وهي عبارة عن أوساط تحوي أهم العوامل والمواد المغذية اللازمة للنمو الجرثومي.

تقسم الأوساط الزرعية حسب الشكل الفيزيائي (وحسب نسبة الآغار) إلى:

- الأوساط الزرعية السائلة (Liquid, Broth Media): تستخدم عادةً لتكثير الجراثيم ودراسة خصائص الجراثيم المعزولة (الاختبارات الكيميائية الحيوية) مثل: المرق المغذي، الماء الهضموني.
- الأوساط الزرعية الصلبة (Solid Media) (1.5-2% agar): تستخدم لعزل الجراثيم وتعدادها مثل: الأغار المغذي، الأغار المغذي بالدم.
- الأوساط الزرعية نصف الصلبة (Semisolid Media) (0.1-0.5% agar): تستخدم لدراسة حركة الجراثيم.



طرق تلوين الجراثيم

- طريقة التلوين البسيط (التلوين بزرقة الميتيلين)
- طريقة التلوين المضاعف (طريقة تلوين غرام)
- طريقة تسيل نلسون.

طريقة التلوين المضاعف (طريقة تلوين غرام)

المحاليل المستخدمة في تلوين غرام:

- ملون بنفسجية الجانسيان
- محلول لوغول.
- مزيل اللون.
- أحمر الفوكسين.

المبدأ: يعتمد تلوين غرام على الاختلاف في تركيب الجدار الخلوي بين الجراثيم إيجابية وسلبية غرام. يحتوي جدار الجراثيم إيجابية الغرام على طبقة أكثر سماكة من الغليكوبيبتيد مما يجعل نفاذية مزيل اللون أكثر صعوبة، ولذلك تحتفظ هذه الجراثيم بالمعقد اللوني المكون من بنفسجية الجانسيان واليود. أما الجراثيم سلبية الغرام فيزول لونها بتأثير مزيل اللون وتكتسب في المرحلة النهائية اللون الأحمر للفوكسين.

خطوات تلوين غرام:

1. تحضر مسحة جرثومية (Bacterial film) على صفيحة زجاجية نظيفة ويتم وضعها على حامل مناسب حتى الجفاف التام.
2. تثبيت المحضر: بتمريره 3- 3 مرات على اللهب، ثم يترك ليبرد ليبدأ بعدها بالتلوين.
2. يغمر المحضر بمحلول بنفسجية الجانسيان لمدة دقيقة
3. يغسل المحضر بالماء لإزالة الفائض من الملون
4. يغمر المحضر بمحلول لوغول لمدة دقيقة
5. يغسل المحضر بالماء لإزالة الفائض من المحلول
6. يغمر المحضر بمزيل اللون (كحول + أسيتون) مدة 30 ثانية
7. يغسل المحضر جيداً بالماء حتى لا يبقى أثر لمزيل اللون
8. يغمر المحضر بمحلول أحمر الفوكسين لمدة دقيقة
9. يغسل المحضر بالماء وينشف.

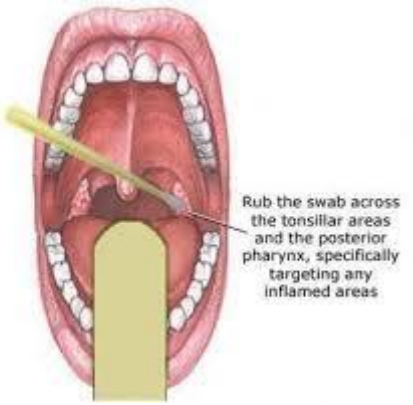
القسم العملي

استخدم الماسحة القطنية العقيمة لأخذ عينة مسحة بلعوم من زميلك (كما هو موضح بالشكل المرافق) وقم بزرعها في وسط المرق المغذي واحضنها بالدرجة $37^{\circ}C$

قم بتحضير مسحة جرثومية من العينة المتبقية وقم بتثبيتها وتلوينها بطريق غرام ثم فحصها تحت المجهر الضوئي باستخدام العدسة الغاطسة

المواد والأدوات

كواشف وأدوات تلوين غرام، ماسحة قطنية، وسط المرق المغذي، حاضنة.



الجلسة العملية الثالثة

زرع الجراثيم والأوساط الزرعية

Bacterial Subculture & culture media

على الرغم من أهمية تلوين غرام في تشخيص الأمراض الجرثومية إلا أن التشخيص النوعي لهذه الأمراض يتطلب تحديد هوية الجرثوم عن طريق إجراء اختبارات نوعية على هذا الجرثوم الموجود بشكل معزول (isolated) ونقي (pure) من العينة المرضية باستخدام طرائق زرع الجراثيم، وهذا تيم عن طريق زرع الجرثوم على أوساط زرعية مناسبة تسمح بتكاثر الجرثوم المسبب للمرض وعزله عن الجراثيم الأخرى.

تقسم الأوساط الزراعية حسب استخدامها إلى:

❶ أوساط زرعية عامة، بسيطة، أساسية (basic, simple media):

تستخدم لتكثير أغلب الأنواع الجرثومية مثل: وسط المرق المغذي (nutrient broth) ، وسط الغراء المغذي (nutrient agar) وسط مولر هينتون.

❷ أوساط زرعية غنية (Enriched media):

هي أوساط زرعية بسيطة مضاف إليها عوامل نمو إضافية تدعم نمو الجراثيم خاصةً تلك التي تحتاج متطلبات معينة (*Nisseria spp*) مثل الدم ويدعى وسط اغار بالدم (Blood agar) ووسط الغراء بالشوكلا (chocolate agar).

❸ أوساط زرعية انتقائية (Selective media):

تحتوي على مواد مثبطة لنمو بعض الجراثيم حيث تسمح بنمو نوع واحد أو أكثر من الأنواع الجرثومية وتثبط نمو أنواع أخرى، مثل وسط ماكونكي ووسط شابمان.

❹ أوساط تفريقية (Differential media):

تسمح بنمو أكثر من نوع من الجراثيم ولكن تسمح بالتفريق بينها من خلال خصائص معينة مثل الخصائص الحيوية كتخمير نوع معين من السكاكر، وتحتوي على مشعر. مثل وسط ماكونكي (MacConkey) يفرق بين أنواع سلبيات الغرام.

عزل الجراثيم والحصول على مزرعة نقية

(Bacterial Isolation & Obtaining Pure Culture)

تحتوي معظم العينات السريرية على أكثر من نوع من الجراثيم وعادةً ما يكون العامل المسبب للمرض هو واحد فقط من هذه الأنواع (Pathogen). إضافةً إلى ذلك حتى نتمكن من دراسة الصفات النوعية للجراثيم (استقلاب، إنتاج أنزيمات معينة، الحساسية على الصادات الحيوية..) يجب أن توجد الجراثيم بشكل مزرعة جرثومية نقية.

(Pure culture) وهي عبارة عن مزرعة جرثومية تحوي عدداً كبيراً من الخلايا الجرثومية التي تنتمي لنوع واحد فقط.

هناك خطوتان أساسيتان للحصول على مزرعة جرثومية نقية ابتداءً من عينة تحوي عدة أنواع جرثومية (mixed population).

1. يجب أن يتم تمديد العينة أو المزرعة الجرثومية حتى نحصل على خلايا جرثومية بعيدة عن بعضها البعض بحيث تعطي بعد نموها على وسط آغار مستعمرات جرثومية مختلفة ومعزولة وبعيدة عن بعضها البعض. يسمى طبق بتري الذي يحوي هذه المستعمرات طبق العزل (isolation plate).

2. يجب أن يتم انتقاء مستعمرة واحدة فقط ومن ثم يتم نقلها وزرعها في وسط زرعي آخر عقيم بحيث يعطي بعد النمو مزرعة جرثومية نقية (pure culture) أي مزرعة جرثومية تحتوي على خلايا جرثومية من نفس النوع.

الاستفراد:

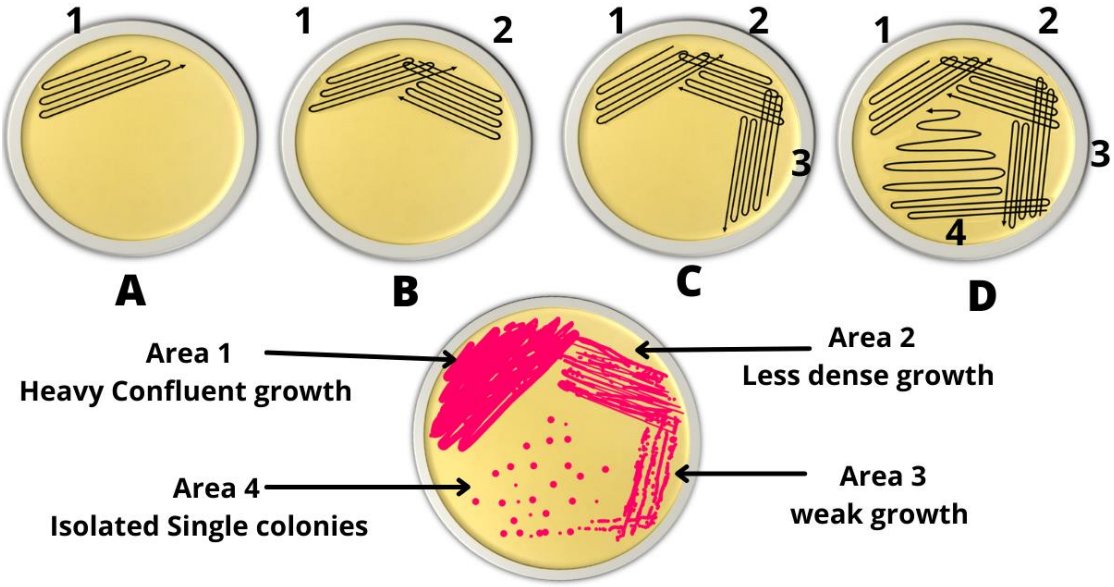
هناك عدة طرق تستخدم من أجل الحصول على مستعمرات معزولة على وسط آغار أهمها طريقة الاستفراد (Streak Plate) وهي عبارة عن طريقة سهلة وسريعة للحصول على خلايا جرثومية متوزعة وبعيدة عن بعضها البعض (معزولة). يعتمد مبدأ الطريقة على تفريغ حمولة العينة على منطقة محددة من وسط الآغار الصلب (منمي عام) في طبق بتري ثم باستخدام قضيب البلاتين يتم نقل الجراثيم إلى منطقة أخرى على شكل خطوط عرضية متوازية (streaking) مع إعادة هذه الخطوة عدة مرات والانتباه إلى تعقيم (تلهيب) عروة البلاتين في كل مرة. في كل مرة يتم فيها تمرير قضيب بلاتين على سطح الآغار (streaking) فإن عدد الجراثيم المنقولة يقل حتى نحصل على منطقة من سطح الآغار تحتوي على خلايا جرثومية بعيدة عن بعضها البعض ومعزولة. بعد الحضن فإن المنطقة الأولى من طبق بتري سوف تظهر تجمع جرثومي مزدحم بينما المنطقة الأخيرة من الزرع (streaking) سوف تحتوي على مستعمرات معزولة كما يمثل الشكل:

نقسم الطبق إلى عدة مناطق، المنطقة A تفريغ حمولة القضيب.

نلهب ونبرد، ثم نسحب من نهاية المنطقة A إلى المنطقة B أربع خطوط متوازية.

نلهب ونبرد، ثم نسحب من نهاية المنطقة B إلى المنطقة C خطوط متوازية.

نلهب ونبرد، ثم نسحب من نهاية المنطقة C إلى المنطقة D خطوط متوازية ومن نهايتها خط زيكزاك نهايته حرة وسط العلبة إلى المنطقة E.



دراسة أشكال المستعمرات:

عند زرع الجراثيم على وسط آغار صلب فإن كل خلية جرثومية تبدأ بالانقسام بشكل أُسِّيّ مشِّكلة آلاف أو حتى ملايين الخلايا الجرثومية على شكل كتلة جرثومية قابلة للرؤيا بالعين المجردة. هذه الكتلة تُسمّى مستعمرة جرثومية (colony). تختلف الجراثيم في شكل وصفات المستعمرات التي تشكلها ويمكن استخدام هذه الخاصية في التمييز ما بين الجراثيم وتحديد هويتها. لكن يجب الأخذ بعين الاعتبار أن شكل المستعمرة لنفس الجرثوم يمكن أن يختلف باختلاف الوسط الزرعي. وعادةً ما تُستخدَمُ المعايير التالية في وصف المستعمرات الجرثومية (Figure 4.1):

❶ الشكل (Shape): دائري، غير منتظم، خيطي، ...

❷ الارتفاع (Elevation): مسطحة، محدبة، مرتفعة، مرتفعة مع وجود بروز، مرتفعة مع وجود انخفاض.

❸ الحواف (Margin): كاملة، متموجة، خيطية، مفصفصة، متعرجة.

❹ الحجم (Size) (أبعاد المستعمرة): يُقاس بالـ ملم.

❺ القوام (Texture): ملساء، خشنة، مخاطية.

❻ اللون (Pigmentation): ملونة أو غير ملونة، يعتبر اللون من أهم صفات المستعمرات الجرثومية والذي ينتج عن أصبغة (pigments) غير منحلة بالماء مثل معظم الجراثيم أو منحلة بالماء كما في اللون الذي تنتجه عصيات القيح الأزرق.

❼ المظهر (Optical property): شفافة، عاتمة، لماعة.

❽ حل الدم (Hemolysis) تصنع بعض الأنواع الجرثومية (المكورات العقدية المقيحة) مواد تسبب انحلال الدم في حال وجوده في الأوساط الزرعية وهذا ما يسمى بالانحلال الدموي وهو ثلاثة أنواع: γ, β, α.

ملاحظات

- يجب أن يتم حضن طبق بتري بعد الزرع مقلوباً وذلك لتجنب تكثف البخار وسقوطه على المزرعة الجرثومية وتشويهها.
- يجب الانتباه إلى كتابة البيانات اللازمة على طبق بتري: الاسم، مصدر العينة، التاريخ،...
- هناك طرق أخرى لعزل الجراثيم مثل طريقة النشر (spread-plate) وطريقة الصب (pour-plate) والتي سيتم دراستها في جلسات عملية لاحقة.

نقل الجراثيم بين الأوساط الزرعية والتقنيات العقيمة

(Bacterial Subculture & Aseptic Technique)

دائماً عند التعامل مع الجراثيم ونقلها (subcultering, transferring) بين الأوساط الزرعية يجب استخدام طريقة عقيمة تمنع دخول جراثيم ملوثة خارجية إلى الأوساط الزرعية. هذه الطريقة تسمى التقنية العقيمة (Aseptic technique).

يمكن أن يتم نقل الجراثيم بين عدة أوساط زرعية كما يلي:

- نقل الجراثيم من وسط سائل إلى وسط صلب: مثال من أجل العزل، الحصول على مزرعة نقية، اختبار التحسس على الصادات وتعداد الجراثيم.
- نقل الجراثيم من وسط صلب إلى وسط سائل: مثال الاختبارات الكيميائية الحيوية النوعية على مزرعة نقية.
- نقل الجراثيم من وسط سائل إلى وسط سائل: مثال إجراء عدة اختبارات كيميائية حيوية نوعية على نفس المزرعة النقية.

القسم العملي

الكواشف والأدوات

مزيج معلق جرثومي في المرق المغذي، ماء عقيم، طبق آغار مغذي، قضيب البلاتين، لهب، كواشف تلوين غرام.

ملخص الجلسة العملية

- **استخدام تقنية الاستفراد للحصول على مستعمرات معزولة من مزيج معلق جرثومي.**
- **تحضير مسحة جرثومية وتثبيتها وتلوينها بطريقة غرام وفحصها تحت المجهر باستخدام العدسة الغاطسة.**
- **التدرب على التقنية العقيمة لنقل الجراثيم بين أوساط زرعية مختلفة.**

التجربة العملية الأولى

استخدم طريقة الاستفراد في عزل الجراثيم من المسحة البلعومية المأخوذة في الجلسة السابقة.

التجربة العملية الثانية

تلوين غرام:

قم بتحضير مسحة جرثومية (bacterial film) على صفيحة زجاجية نظيفة كما يلي:

- من مزرعة جرثومية في وسط سائل

استخدم قضيب بلاتين معقم لنقل جزء من الجراثيم من الوسط الزرعي السائل إلى منتصف الصفيحة.

- من مزرعة جرثومية في وسط صلب

استخدم قضيب بلاتين معقم لنقل قطرة ماء إلى منتصف الصفيحة وقم بنشرها على طول 2-1سم ثم بعد تعقيم قضيب البلاتين والانتظار حتى يبرد قم بنقل جزء من مستعمرة جرثومية إلى الصفيحة وامزجها مع القطرة على شكل خط مستقيم بطول 1سم تقريباً.

قم بتثبيت المحضر بتمرير الصفيحة على اللهب عدة مرات.

قم بوضع الصفيحة على حامل مناسب وتلوينه بطريقة غرام.

التجربة العملية الثالثة

استخدم التقنية العقيمة وقم بنقل الجراثيم من وسط المرق المغذي السائل إلى وسط مرق مغذي سائل آخر.

استخدم التقنية العقيمة وقم بنقل عينة من وسط ماء عقيم إلى وسط المرق المغذي السائل (شاهد سلبي).

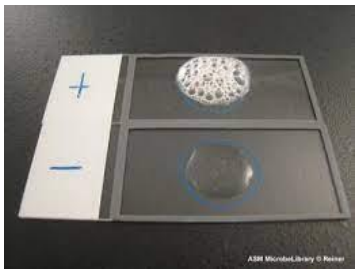
الاختبارات الكيميائية الحيوية وتحديد هوية الجراثيم 1
BIOCHEMICAL (IDENTIFICATION) TESTS

على الرغم من أهمية تلوين غرام في تشخيص الأمراض الجرثومية إلا أن التشخيص النوعي لهذه الأمراض يتطلب+ تحديد هوية الجرثوم عن طريق إجراء اختبارات نوعية على هذا الجرثوم الموجود بشكل معزول (isolated) ونقي (pure) من العينة المرضية. تختلف الجراثيم عن بعضها في شروط النمو، نوع المواد المستقبلة، والأنزيمات النوعية وبالتالي يمكن تحديد هوية الجراثيم باستخدام اختبارات كيميائية حيوية تعتمد على شروط الزرع، قدرة الجرثوم على استقلاب مواد معينة، إنتاج غاز، امتلاك الجرثوم لأنزيمات معينة واختلاف نواتج الاستقلاب النهائية.

1- في حال كانت نتيجة التلوين مكورات إيجابية غرام، للتفريق بين المكورات إيجابية الغرام المرضية يجرى اختبار الكاتلاز.

اختبار الكاتالاز: CATALASE TEST

يعتبر هذا الاختبار من الاختبارات الأساسية في تحديد هوية الجراثيم إيجابية الغرامة حيث يستخدم للتفريق بين المكورات العنقودية التي تملك أنزيم الكاتالاز والمكورات العقدية التي لا تملك هذا الأنزيم ويعتمد على قدرة هذا الأنزيم على تفكيك الماء الأوكسيجيني إلى ماء وغاز الأوكسجين. يجرى الاختبار بإضافة عدة قطرات من الماء الأوكسيجيني على المستعمرات المراد فحصها (وملاحظة ظهور فقاعات) مع الانتباه إلى إغلاق علبة بتري مباشرةً بعد إضافة الماء الأوكسيجيني. يمكن أن يجرى الاختبار أيضاً على صفيحة زجاجية ضمن علبة بتري فارغة.



في حال أعطى تلوين غرام مكورات إيجابية وكان اختبار الكاتلاز سلبي، نتوجه لجنس العقديات وللتميز بين أنواع المكورات العقدية نستخدم وسط Blood agar، وهو وسط غني فيه دم خروف أو دم حصان بنسبة 5% وتفريقي تبعاً لأنماط حل الدم، والتي ستعطي إما:

انحلال جزئي للدم (ألفا): تملك أنزيم ألفا هيمولايزين لتتشكل هالة خضراء كمثال العقدية الرئوية.

انحلال كلي للدم (بيتا): تملك أنزيم بيتا هيمولايزين لتتشكل هالة شفافة كمثال العقدية المقيحة.

لا يوجد انحلال للدم (غاما): يبقى الوسط كما هو.

في حال أعطى تلوين غرام مكورات إيجابية واختبار الكاتلاز إيجابي، نتوجه لجنس العنقوديات وللتميز بين نوع العنقوديات المذهبة وباقي أنواع العنقوديات غير الممرضة، نستخدم اختبار المخثراز بالإضافة إلى الزرع على وسط شابمان أو وسط MSA.

اختبار المخثراز COAGULASE TEST

يعتبر من الاختبارات المهمة في تشخيص المكورات العنقودية حيث يفرق بين المكورات العنقودية الذهبية التي تحوي هذا الأنزيم والمكورات العنقودية الأخرى التي لا تحوي هذا الأنزيم. يتم الاختبار إما على صفيحة أو ضمن أنبوب

- على صفيحة (Slide test)

ويستخدم للكشف عن المخثراز. توضع قطرة بلازما على صفيحة زجاجية ثم يضاف كتلة من الجراثيم المراد فحصها، يدل تشكل تحوصب خلال 10-15 ثانية على إيجابية الاختبار.

- ضمن أنبوب (Tube test)

ويستخدم للكشف عن المخثراز: يتم مزج 0.5 مل من المعلق الجرثومي مع 0.5 مل بلازما ضمن أنبوب اختبار، بعد الحضن يدل تشكل خثرة على وجود أنزيم المخثراز أي إيجابية الاختبار.

وسط MANITOL-SALT-AGAR (MSA)

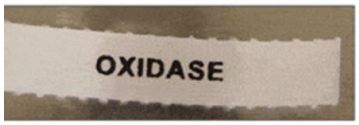
وهو وسط انتقائي للمكورات العنقودية حيث يحتوي على نسبة عالية من ملح كلور الصوديوم (7.5%) التي تسمح بنمو هذه الجراثيم فقط كما يحتوي على سكر المانيتول **ومشعر أحمر الفينول** للتفريق بين المكورات العنقودية الذهبية المخمرة للمانيتول (يتغير لون الوسط إلى أصفر) والمكورات العنقودية غير المخمرة للمانيتول (لون زهري أحمر).

2-في حالة ظهور عصيات سلبية غرام في تلوين غرام، نقوم باختبار الأوكسيداز

اختبار الأوكسيداز: OXIDASE TEST

يعتبر هذا الاختبار من الاختبارات الأساسية في تحديد هوية الجراثيم سلبية الغرام حيث يستخدم للتفريق بين العصيات الزنجارية (pseudomonase) التي تملك أنزيم الأوكسيداز وجراثيم زمرة الأمعائيات (Enterobacteriacae) التي لا تملك هذا الأنزيم. يجري الاختبار بتشريب ورقة ترشيح بعدة قطرات من كاشف الأوكسيداز (محلول 1% تترامثيل بارافينيلين دي امين) ثم وضعها في علبة بتري ثم يتم مسح جزء من المستعمرة الجرثومية المراد فحصها على ورقة الترشيح. يشير ظهور لون بنفسجي غامق خلال 10 ثوان إلى إيجابية الاختبار، بينما يكون الاختبار سلبياً إذا لم يتطور لون خلال فترة 60 ثانية. في حالة كان الاختبار إيجابي نكمل بالزراعة على

Oxidase positive



Oxidase negative

وسط ستراميد آغار .

وسـط سـيتراميد آغار : هو وسـط انتقائي لعصـيات القيح الأزرق، حيث أنه يثبط كل أنواع الجراثيم ويسـمح لعصـيات القيح الأزرق بالنمو، ويحفز السـيتراميد هذه العصـيات على انتاج الصـباغ الخاص بها، والذي ينتشـر في الوسـط لأنه منحل في الماء فيظهر اللون الأخضـر على الوسط.

إذا كانت النتيجة سلبية في اختبار الأوكسداز والزرع على وسط السيتراميد آغار، نقوم بالزرع على ثلاثة أوساط زرعية انتقائية وتفريقية.

1- وسط ماكونكي: MacConkey media

وهو وسط انتقائي لسلبيات الغرام حيث يحتوي على أملاح صفراوية تسمح بنمو هذه الجراثيم فقط ولا يسمح للجراثيم إيجابية الغرام بالنمو كما يحتوي على سكر اللاكتوز ومشعر **أحمر المعتدل** للتفريق بين الأمعائيات المخمرة للاكتوز والتي تظهر مستعمراتها ملونة كمثال (العصيات الكولونية والكليبسلا) والأمعائيات غير المخمرة للاكتوز والتي تكون مستعمراتها غير ملونة كمثال (السلمونيلا والشيغلا والمتقلبات).

2- (EOSIN METHYLENE BLUE AGAR) EMB

وسط انتقائي لسلبيات الغرام وتفريقي يستخدم لتشخيص وعزل العصيات المعوية سلبية الغرام (الأمعائيات) حيث يثبط نمو الجراثيم إيجابية الغرام. يدخل في تركيبه سكر اللاكتوز، الأيوزين، أزرق الميثيلين. وبالتالي فهو وسط تفريقي بين الجراثيم المخمرة للاكتوز وغير المخمرة من مجموعة الأمعائيات، ويستخدم لتشخيص العصيات الكولونية التي تعطي لمعة اليود على هذا الوسط، بينما تعطي الكلبسيلا مستعمرات مخاطية ذات لون أحمر خفيف، أما باقي الجراثيم غير المخمرة للاكتوز تعطي مستعمرات غير ملونة.

3- وسط SS (SALMOELLA SHIGELLA AGAR)

وسط انتقائي لسلبيات الغرام ويدعم نمو السلمونيلا والشيغلا، يحتوي على أملاح الصفراء و Brilliant green وسكر اللاكتوز ومشعر أحمر المعتدل بالإضافة إلى الثيوسلفات وسيترات الحديد التي لهما دور في الكشف عن كبريتيد الهيدروجين H_2S التي تظهر بشكل مستعمرات ذات مركز أسود في حال وجوده. مثل: السلمونيلا والمتقلبات (تظهر مستعمراتها شفافة ذات مركز أسود).

اختبار اليورياز UREASE TEST

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود أنزيم اليورياز لدى بعض جراثيم الأمعائيات. تنتج جراثيم المتقلبات (Proteus) هذا الأنزيم خلال ساعات قليلة من النمو وجراثيم الكلبسيلا (Klebsiella) خلال يوم أو يومين بينما لا تنتج جراثيم السـلمونيلا والشـيغلا (Slamonella, Shigella) هذا الأنزيم. يقوم أنزيم اليوريـاز بتفكيك البولـة إلى أمونيـا وبـالتـالي يتم الكشـــف عن هذا الأنزيم في

اختبار اليورياز بزرع الجراثيم على السـطح المائل لوسـط (Christensen) الذي يحتوي على غلوكوز، بولة، ومشعر **أحمر الفينول** الذي يعطي الوسط لون أصفر، يؤدي إنتاج اليورياز لتفكيك البولة وتحول الوسط إلى اللون الأحمر دالًّا على إيجابية الاختبار.

القسم العملي

المواد والأدوات
أوساط زرعية مختلفة لإجراء بعض الاختبارات الكيميائية الحيوية
معلقات جرثومية متنوعة
أدوات زرع جرثومي

ملخص الجلسة العملية

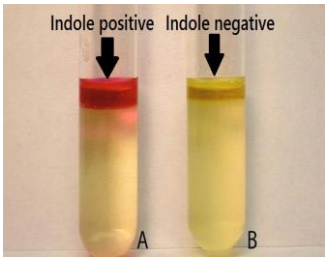
- **تحضير مزرعة جرثومية نقية من الجراثيم المعزولة مسبقاً**
- **إجراء الاختبارات الكيميائية التالية:**
- **الكاتالاز، المخثراز، الأوكسيداز.**
- **زرع الأوسـاط الانتقائية بالمعلقات الجرثومية المتوفرة وقراءة النتائج في الجلسـة العملية القادمة.**
- **تم مسـبقاً زرع معلق جرثومي مجهول والحضـن بالشـروط المناسـبة والمطلوب قراءة النتائج وتحديد هوية الجرثوم المجهول.**

الجلسة العملية الخامسة

الاختبارات الكيميائية الحيوية وتحديد هوية الجراثيم 2
BIOCHEMICAL (IDENTIFICATION) TESTS

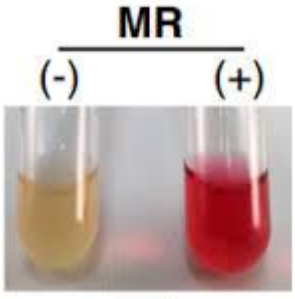
اختبار IMViC

1- اســـتقلاب الحموض الأمينية والبروتينات اختبار إنتاج الاندول: INDOLE PRODUCTION



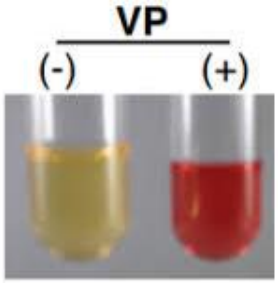
يستخدم هذا الاختبار لكشف قدرة بعض الجراثيم على استقلاب الحمض الأميني التربتوفان إلى الإندول الذي يتم الكشف عنه بإضافة كاشف كوفاكس (Kovac's reagent). يجري الاختبار بزرع الجرثوم في وسط الماء الهضموني السائل (وسط غني بالتريبتوفان) ثم الحضن بالدرجة 37°C لمدة 24-48 ساعة ثم يضاف على جدار الأنبوب عدة قطرات من الكاشف السابق المؤلف من (بارا دي متيل أمينو بنز ألدهيد + الغول الإيزو اميلي) فتظهر حلقة بلون أحمر شديد على السطح في حال إيجابية التفاعل كما في حالة (E.coli).

2- اختبار أحمر الميتيل Methyl Red test (MR)



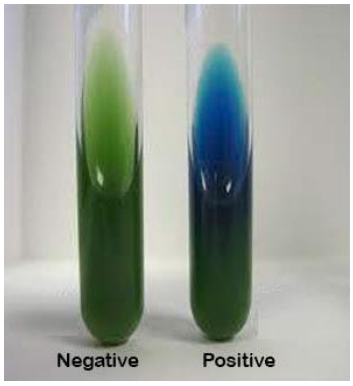
يستخدم اختبار أحمر الميتيل لقياس درجة استقلاب الغلوكوز وتحديد فيما إذا كانت نواتج الاستقلاب شديدة الحموضة (E.coli) أومعتدلة (*Klebiella aerogenes*). ويعتمد على زرع الجرثوم في وسط زرعي سائل مناسب يحوي على الغلوكوز(وسط MR-VP) ثم الحضن بدرجة حرارة 37°C لمدة 24-48 ساعة، ثم يُضاف بعد الحضن مشعر أحمر الميتيل حيث يدل تغير لون الوسط إلى اللون الأحمر على إيجابية الاختبار (بسبب وجود منتجات شديد الحموضة) بينما بقاء اللون الأصفر يدل على السلبية (منتجات معتدلة الحموضة)

3- اختبار VOGES-PROSKAUER (VP):



يتم الكشف بهذا الاختبار عن وجود مادة أسيتيل ميتيل كاربينول (AMC) (معتدلة الحموضة) الناتجة عن استقلاب الغلوكوز. يستخدم هذا الاختبار للتمييز بين جراثيم الأمعائيات حيث يجري بزرع الجرثوم في وسط زرعي سائل حيوي على الغلوكوز(وسط MR-VP) ثم الحضن بدرجة حرارة 37°C لمدة 24-48 ساعة، وبعد الحضن يضاف 0.5مل محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40% (كاشف VP1) و1.5مل من محلول α نفتول 5% الكحولي (كاشف VP2) إلى الوسط ثم يتم رج الأنبوب الزرعي بشكل جيد حيث يتشكل لون أحمر أرجواني خلال خمس دقائق في حال إيجابية الاختبار (أي وجود مادة أستيل متيل كاربينول) (مثال *klebsiella aerogenes, Vibrio elter*) بينما يكون الاختبار سلبياً في حالة *E.coli, Vibrio cholera*.

4- اختبار استعمال السيترات CITRATE TEST:



يستخدم هذا الاختبار لتحديد قدرة الجرثوم على استعمال السيترات كمصدر وحيد للكربون واستعمال أملاح الأمونيوم كمصدر للنتروجين. يجري الاختبار بزرع الجرثوم في وسط سائل يحوي السيترات كمصدر وحيد للكربون وأملاح الأمونيوم كمصدر وحيد للنتروجين، (Koser's medium)، يدل وجود العكر في الوسط، بعد الحضن، على نمو الجرثوم بوجود السترات فقط أي إيجابية الاختبار بينما يبقى الوسط رائقاً في حال عدم النمو الجرثومي أي إن الاختبار سلبي. يمكن أن يجري الاختبار بطريق ثانية وذلك بزرع الجرثوم على السطح المائل لوسط سيمون الصلب المائل (SLANT) ثم الحضن بالدرجة والفترة المناسبتين. يعتبر الاختبار إيجابي في حال وجود النمو الجرثومي على الوسط وتغير لون المشعر في الوسط من الأخضر إلى الأزرق. يحتوي وسط سيمون على السترات كمصدر وحيد للكربون، مواد مغذية وأملاح الأمونيوم ومشعر أزرق برومو التيمول الذي يعطي الوسط لون أخضر في PH<6.9. في حال استقلاب السترات يتم إنتاج مواد قلوية ترفع Ph الوسط (7.6<) مغيرة لون الوسط إلى الأزرق.

-اختبارات تفاعلات استقلابية أخرى:

وســط كليغلر KLIGLER IRON AGAR (KIA) أو TRIPLE SUGAR IRON (TSI):

يستخدم هذا الوسط لتشخيص الجراثيم المعوية سلبية الغرام، حيث يحدد قدرة الجرثوم على تخمير السكاكر (غلوكوز 1 غ/ل ولاكتوز 10 غ/ل في وسط KIA) أو (غلوكوز 1 غ/ل ولاكتوز 10 غ/ل وسكاروز 10 غ/ل في وسط TSI). يحتوي هذا الوسط بالإضافة للسكاكر على: مشعر أحمر المعتدل (لونه أحمر في وسط قلوي وأصفر في وسط حمضي)، أملاح الحديد، حموض أمينية كبريتية. يزرع الجرثوم في الوسط، الموجود بشكل مائل (Slant) ضمن أنبوب، على السطح وفي العمق ويحضن لمدة 24 ساعة بالدرجة $37^{\circ}C$. يزرع الأنبوب بطريقتين بنفس الوقت على السطح وفي العمق لدراسة قدرة الجراثيم على النمو في الشروط الهوائية واللاهوائية. يؤدي تخمر السكاكر إلى تغير لون الوسط إلى الأصفر بسبب تغير لون المشعر، وإذا ترافق تخمر السكاكر مع إنتاج غاز ثنائي أكسيد الكربون يلاحظ تشكل فراغ في أسفل الأنبوب. إن ظهور لون أسود يدل على انتاج الجرثوم لغاز H_2S كبيريت الهيدروجين كما هو الحال في السلمونيلا ويعزى ذلك إلى تفاعل غاز كبريت الهيدروجين مع أملاح الحديد الموجودة في الوسط لتشكيل كبريت الحديد ذو اللون الأسود.

تفسير النتائج: أحمر=قلوي، أصفر=حمضي

السطح/العمق	**تفسير النتيجة**
أحمر/أصفر	الجرثوم يخمر الغلكوز فقط ويستعمل الهضمون
أصفر/أصفر	الجرثوم يخمر الغلكوز واللاكتوز
أحمر/أحمر	الجرثوم لا يخمر أي سكر، فقط استعمال الهضمون بالأكسدة
راسب أسود	انطلاق غاز H_2S حيث يترسب الكبريت مع الحديد في الوسط
تشقق الوسط	انطلاق غاز Co_2 نتيجة تخمر السكاكر

الاختبارات الكيميائية باستخدام الطرق التجارية:

تتوفر في الأسواق طواقم تجارية تستخدم في تحديد هوية الجراثيم بالاعتماد على الاختبارات الكيميائية الحيوية. تتكون غالباً من شرائط تحوي حفر معينة تحتوي بدورها على أوساط زرعية مناسبة (بالحالة الجافة) لأوساط الاختبارات الكيميائية الحيوية، يتم ترطيبها بالمعلق الجرثومي المراد دراسته ومن ثم الحضن بالدرجة والفترة المناسبتين وتفسير النتائج اعتماداً على تغير اللون في الحفر واستخدام جداول خاصة لتحديد هوية الجرثوم.

القسم العملي

- **قراءة نتائج الزرع على الأوساط الانتقائية للجلسة العملية السابقة.**
- **اجراء الاختبارات الكيميائية الحيوية (أحمر الميتيل، الإندول، VP، السيترات) والحضن بالدرجة 37 لمدة 24 ساعة ليتم قراءتها في الجلسة القادمة.**
- **زراعة جرثوم من زمرة الامعائيات على وسط كليغلر (على السطح وفي العمق) والحضن بالدرجة 37 لمدة 24 ساعة وقراءة النتائج في الجلسة القادمة.**

الجلسة العملية السادسة

اختبارات التحسس على الصادات الحيوية
(Antibiotic Susceptibility Testing)

يعتبر تحديد حساسية الجراثيم للصادات الحيوية من الاختبارات المهمة في المخبر الجرثومي وذلك لأنه على الرغم من أنه يمكن التنبؤ بحساسية بعض الجراثيم تجاه صادات حيوية معينة فإنه من الصعب التنبؤ بحساسية غالبية الجراثيم تجاه الصادات الحيوية (العصيات الزنجارية، المكورات العنقودية الذهبية، الأمعائيات مثل العصية القولونية والمتقلبات)، خاصةً بعد انتشار سلالات جرثومية مقاومة للصادات الحيوية. وهنا تكمن أهمية اختبارات التحسس على الصادات الحيوية في تحديد واختيار الصادات الحيوية الفعالة تجاه سلالة جرثومية معينة عند مريض معين. هناك عدة اختبارات يمكن أن تساعد الطبيب في اختيار الصاد الحيوي الأكثر فعالية تجاه عامل جرثومي أو سلالة جرثومية محددة.

- اختبارات التحسس على الصادات الحيوية

- اختبار التمديد في أنابيب (Tube Dilution tests)

يتم في هذه الطريقة تحضير سلسلة تراكيز متزايدة مضاعفة من الصاد الحيوي باستخدام وسط زرعي سائل. ثم يتم زرع كمية محددة وثابتة من الجرثوم في كل من هذه التراكيز. بعد الحضن لمدة 16-20 ساعة في الدرجة 35°C يلاحظ النمو الجرثومي (عكر) ويتم اختيار أصغر تركيز من الصاد الحيوي الذي أدى إلى تثبيط النمو الجرثومي (عدم وجود عكر بالعين المجردة) وهو موافق للتركيز الأدنى المثبط للنمو الجرثومي (Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

يمكن استخدام هذه الطريقة لتحديد التركيز الأدنى القاتل للجراثيم Minimum Bactericidal concentration (MBC) وذلك بالزرع فقط من الأنابيب التي لم يحدث فيها نمو واختيار أصغر تركيز لم يعطي نمو جرثومي على وسط زرعي عام صلب، وبالتالي يكون MBC هو أدنى تركيز قاتل للجراثيم بنسبة 99.9%.

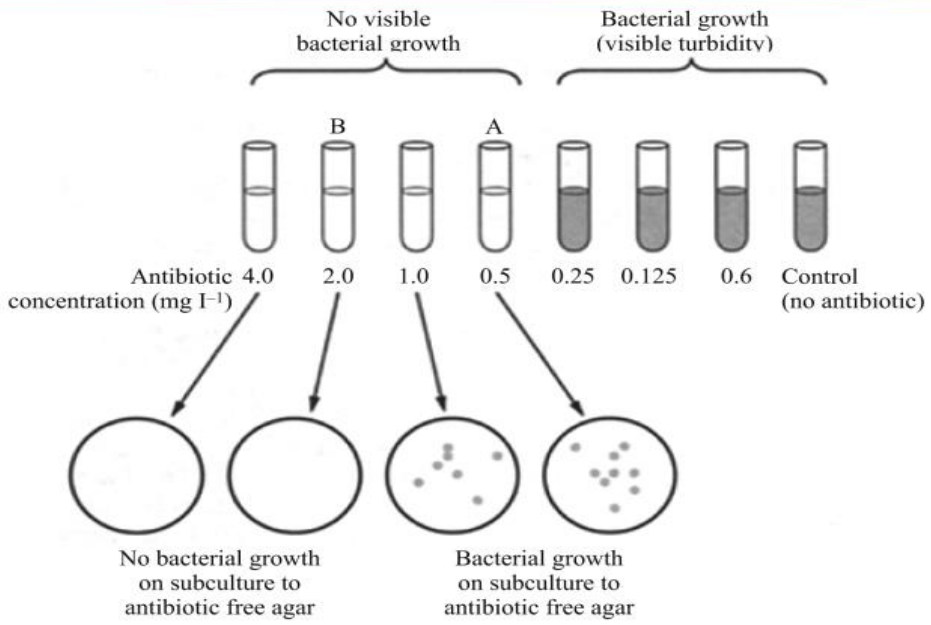


Fig. 12.6: MIC and MBC testing. In this example, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotic is 0.5 mg/l (tube a). The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is 2.0 mg/l (tube B).

ـ طريقة الانتشار من الأقراص الورقية:

Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على انتشار الصاد الحيوي المشرب على قرص ترشيح بقطر (6-mm) بكمية ملائمة وكافية ضمن وسط أغار صلب مزروع بالجرثوم بطريقة الفرش Spreading وبعد الحضن بالدرجة والفترة المناسبتين (18-20 ساعة/35°C)، تتشكل حول الأقراص هالات عدم نمو (zones of inhibition) يتناسب قطرها مع فعالية الصاد الحيوي (مع الأخذ بعين الاعتبار تأثير عوامل أخرى على قطر الهالة). يتم قياس قطر هالة عدم النمو ومقارنتها باستخدام جداول خاصة لتحديد إذا ما كان الجرثوم: حساس، متوسط المقاومة أو مقاوم للصاد الحيوي المدروس.

ملاحظات:

- الوسط المستخدم هو وسط موللر-هنتون Muller-Hinton المناسب لنمو معظم الجراثيم والذي يجب أن تكون سماكته 4-6مم.
- إضافةً إلى فعالية الصاد، تؤثر عوامل أخرى على قطر هالة عدم النمو مثل: سماكة الوسط الزرعي، الخواص الانحلالية والوزن الجزيئي للصاد الحيوي.
- يتم تحضير المعلق الجرثومي المناسب للزرع وفقاً لسلسلة ماكفارلاند (MacFarland Standard Tube) التي تتكون من سلسلة محاليل أو معلقات من كبريتات الباريوم أو جزيئات اللاتكس بتراكيز مختلفة تستخدم كمحاليل مقارنة لتقدير عكر النمو الجرثومي. يجب أن يكو المعلق الجرثومي موافقاً لعكر أنوب ماكفارلاند (0.5).

خطوات اختبار التحسس على الصادات بطريقة الانتشار

Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test

تحضير المعلق الجرثومي:

- ينقل 4-5 مستعمرات جرثومية إلى أنبوب اختبار يحتوي 2مل مصل فيزيولوجي ويمزج بشكل جيد حتى الحصول على معلق جرثومي متجانس.
- يفحص المعلق الجرثومي ويعدل حتى الحصول على عكر موافق لعكر أنبوب ماكفارلاند 0.5.

زرع الجراثيم على وسط موللر-هنتون:

- تغمس ماسحة قطنية في المعلق الجرثومي المحضر مسبقاً ثم يتم التخلص من الكمية الزائدة منه
- تفرش المسحة على كامل سطح الأغار لوسط موللر-هنتون في علبة بتري ثم تعاد الخطوة ثلاث مرات بعد تدوير علبة بتري بدرجة 60.
- يتم التخلص من الكمية الزائدة من العينة المأخوذة.
- يتم تغطية العلبة جزئياً ثم يترك الوسط 2-5 دقائق حتى يجف.

وضع أقراص الصادات الحيوية:

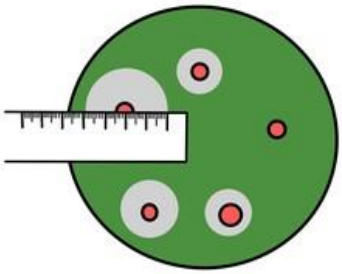
- يعقم الملقط باللهب ثم يستخدم في أخذ قرص الصاد الحيوي ويتم وضعه على الوسط الزرعي الصلب مع الضغط بلطف لتثبيته.
- تعاد الخطوة السابقة مع كل قرص جديد.
- يعاد غطاء العلبة، ثم تقلب العلبة ويتم الحضن بدرجة $35^{\circ}C$ مدة 16-18 ساعة.

ملاحظات

- تجنب وضع الأقراص بقرب حافة علبة بتري.
- تجنب وضع أكثر من 5 أقراص في علبة بتري بأبعاد (90mm) أو 12 قرص في علبة بتري بأبعاد (150mm).
- يجب أن لا تقل المسافة بين مركزي أي قرصين عن (24mm).
- يمكن استخدام أداة (Multidisk dispenser) لوضع أكثر من قرص بنفس الوقت.

قراءة النتائج:

بعد الحضن تقاس قطر هالات عدم النمو حول كل قرص وتسجل النتائج، ثم تقارن باستخدام جداول خاصة لتحديد حساسية الجرثوم لمختلف الصادات واختيار الصاد الأكثر فعالية وملاءمة.



E.coli and other enteric Gram Negative Rods (Zone Diameter, nearest whole mm)

	Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin (30 μg)	≤ 14	15-16	≥ 17
Ampicillin (10 μg)	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefazolin (30 μg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Gentamicin (10 μg)	≤ 12	13-14	≥ 15
Tetracycline (30 μg)	≤ 14	15-18	≥ 19

Ticarcillin (75 μg)	≤ 14	15-19	≥ 20
Trimethoprim (5 μg)	≤ 10	11-15	≥ 16
Tobramycin (10 μg)	≤ 12	13-14	≥ 15

هناك عوامل تؤثر في اختيار الصاد:

نوع الجرثوم، طيف وفعالية الصاد، عوامل لها علاقة بالمريض (يتحسس على نوع معين من الصادات، حوامل، العمر، حالة المريض الصحية إذا كان لديه مشاكل كلوية أو كبدية.....)، بالإضافة إلى مكان الانتان وإمكانية إيصال الصاد له.

القسم العملي

الكواشف والأدوات

لهب (مصباح بنزن)، أقراص صادات حيوية متنوعة، ملقط، أوساط موللر-هنتون، ماسحة قطنية، أطباق بتري تحوي مستعمرات جرثومية معروفة ومعزولة. 2-3 مل مصل فيزيولوجي في أنابيب اختبار، حاضنة (35-37°C)، مسطرة، أوساط موللر-هنتون

التجربة العملية

- تحضير معلق جرثومي موافق لأنبوب ماكفارلاند (0.5) ثم الزرع على وسط موللر-هنتون بطريقة الفرش واستخدام طريقة kirby-bauer في تحديد حساسية الجرثوم المدروس لعدد من الصادات الحيوية.

تلوين تسيل نلسن Ziel Nelsen stain
(Acid fast stain)

يستخدم تلوين تسيل نلسن بشكل رئيسي لتلوين المتفطرات السلية Mycobacterium Tuberculosis التي تسبب مرض التدرن (السل) Tuberculosis والذي ممكن أن يصيب عدة أجزاء من الجسم ولكن أشهره السل الرئوي.

وهي عصيات ذات نهايات مدورة قد تكون منحنية طولها 2-7 ميكرون وعرضها 0.3 ميكرون، غير مبذرة، عديمة المحفظة، غير متحركة، اكتشفها العالم Koch عام 1882 عند مريض مصاب بالسل، وهي جراثيم هوائية مجبرة تنمو ببطء شديد في الدرجة 37 وتحتاج في نموها إلى بعض المواد الخاصة وإلى وجود الأكسجين بنسبة عالية (هوائية مجبرة)، من أهم المستنبتات المستخدمة لزرع المتفطرات السلية هو مستنبت لوفنشتاين، حيث تظهر مستعمراتها بعد 4- 6 أسابيع بلون كريمي ومظهر خشن تشبه الثآليل، ولا يحكم على نتيجة الزرع السلبية إلا بعد مرور أكثر من 8 أسابيع.

التشخيص المباشر

1- **تلوين تسيل نلسن:** حساسيته (100-1000 عصية/مل)

مبدأ التلوين:

تحوي المتفطرات السلية فوق جدارها الخلوي على طبقة تحتوي نسب مرتفعة من المواد الدسمة (شموع وحموض دسمة وليبيدات) Mycolic acid 60 %، لذلك فهي مقاومة للحمض والكحول أثناء التلوين، لا تتلون بغرام في الأوقات العادية. يمكن لهذه الجراثيم أن تتلون بالفوكسين المركز بتركه لفترة طويلة (نصف ساعة) أو بتسريع تلوينها باستخدام الحرارة. بعد أن تكسب العصيات لون الفوكسين الأحمر. لا يمكن إزالة اللون باستخدام مزيج من الحمض والغول ولذلك تسمى هذه الجراثيم مقاومة للحمض والغول.

أما المرحلة الأخيرة من تلوين تسيل نلسن فتتضمن استخدام زرقة الميتيلين الذي يلون كامل المحضر باستثناء العصيات السلية التي تبقى محتفظة باللون الأحمر للفوكسين بحيث تبدو بلون أحمر على خلفية زرقاء.

2- **الزرع:** حساسيته تكون من (10-100 عصية/مل)

- وسط صلب مائل لوفينشتاين جنسون (يحتوي بشكل أساسي على البيض و Brilliant green لمنع نمو الزمرة الجرثومية الطبيعية). يعتمد على الزرع لتأكيد الإصابة وليس للتشخيص (فترة الحضن الطويلة).
- تبدو مستعمرات المتفطرة السلية على وسط لوفينشتاين جنسن بشكل رأس القرنبيط.

3- PCR: حساسيتها (1-10 عصية /مل)

تعتمد هذه الطريقة على البحث عن وجود DNA للخلية الجرثومية،

التشخيص غير المباشر

اختبار مانتوكس : يساعد في عزل الأشخاص المصابين أو الذين تعرضوا للإصابة سابقا عن غير المصابين في حالة الوباء. تعتمد على رد الفعل المناعي الخلوي المتأخر، وذلك بحقن مادة بروتيتية موجودة في عصية السل (التوبركولين) تحت الجلد. بعد الحقن ننتظر 72 ساعة (يومين أو ثلاثة) ونراقب ردة فعل الجسم تجاه الحقن في موضع الحقن (انتفاخ محمر وقاس)، وفي حال عدم حدوث ردة فعل فالشخص سليم وغير متعرض لعصية السل أبداً ويجب تلقيحه.

تلوين تسيل نلسن في عينة القشع:

1- مجانسة العينة (تمييعها) والتخلص من الزمرة الجرثومية الطبيعية (التي قد تكون موجودة في العينة لاختلاطها مع اللعاب):
يتم تحرير البكتريا بعملية الهرس الميكانيكي، ثم يضاف عليه N-acetyl-L-cysteine كمادة حالة للمواد المخاطية وتعمل على تمييع القشع، وبعدها يتم إزالة جراثيم الزمرة الطبيعية بإضافة NaOH 4%.

2- مراحل التلوين:

- يغمر المحضر بمحلول الفوكسين الكثيف مدة 15-30 دقيقة بحرارة المخبر أو خمسة دقائق بالفوكسين الحار (بالتسخين إلى بدء تصاعد البخار).
- يغسل المحض بالماء.
- يغمر المحضر بمزيل اللون (حمض الآزوت الثلاثي أو مزيج من حمض وكحول) مدة 1-2 دقيقة حسب سماكة المحضر.
- يغسل المحضر بالماء.
- يغمر المحضر بمحلول زرقة المتيلين مدة 30-60 ثانية.
- يغسل المحضر بالماء وينشف.

القسم العملي

تلوين تسل–نلسون Acid fast stain (Ziehl-Neelsen Stain)

1. حضِّر مسحة جرثومية (Bacterial film) على صفيحة زجاجية نظيفة وضعها على حامل مناسب.

2. قم بتغطية المحضر الجرثومي المثبت بمحلول الفوكسين المركز ثم قم بتسخينه من الأسفل باستخدام مصباح بنزن، حتى يمكن رؤية البخار يتصاعد عند إبعاد اللهب.

3. قم بإزالة الملون من الصفيحة واغسل بالماء.

4. أعد الصفيحة إلى الحامل ثم اغمرها بالكحول الحمضي (acid-alcohol) مدة 1-2 دقيقة.

5. كما في السابق قم بإزالة الكاشف واغسل الصفيحة جيداً بالماء.

6. قم بإضافة الملون المعاكس (أزرق الميتيلين) وانتظر

دقيقة.

7. اغسل الصفيحة بشكل جيد بالماء من كل الجوانب، انتظر حتى تجف (يمكن استخدام أوراق ترشيح نظيفة لهذه الغاية) وبعد جفافها تماماً قم بفحصها تحت المجهر.

الاختبارات المصلية
(Serological Tests in Diagnostic Microbiology)

من الصعب في بعض الأحيان تشخيص الأمراض الجرثومية باستخدام الطرق الجرثومية آنفة الذكر (تلوين غرام، زرع الجراثيم....) وهنا يأتي دور الطرق المصلية. إضافةً إلى دور الأضداد في الوقاية من الإنتانات، فإن لها دوراً في تشخيص هذه الإنتانات وذلك باستخدام الاختبارات المصلية والتي تعتمد على التفاعل النوعي ما بين الأضداد والمستضدات.

تستخدم هذه الاختبارات في:

- تحديد هوية العامل الممرض المجهول والمعزول من المريض باستخدام أضداد نوعية معلومة:
  - التنميط المصلي للسلمونيلا والشيغلا (Serologic Typing of Salmonella and Shigella)
  - التنميط المصلي للمكورات العقدية (Serologic Typing of Streptococci)
  - كشف وجود النيسيريا السحائية والبنية
- كشف ومعايرة الأضداد النوعية المجهولة باستخدام مستضدات جرثومية أو معلقات جرثومية معلومة:
  - اختبار فيدال ورايت (Widal & Wright tests)، اختبار ASLO

الاختبارات المصلية

- التراص (التحوصب) Agglutination tests
- اختبار الترسيب Precipitation
- اختبار تثبيت المتممة Complement-fixation Test
- التألق المناعي Immunofluorescence
- الإليزا Enzyme-Linked Immune Assay (ELIZA)

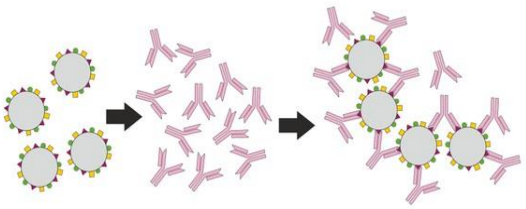
اختبار التراص (التحوصب) Agglutination tests

يعتمد هذا الاختبار على الارتباط ما بين الأضداد النوعية (الموجودة في المصل) مع مستضداتها النوعية الموجودة على سطح الخلايا الجرثومية مسببة تراصها أو تحوصبها.

يجري هذا الاختبار إما على صفيحة **(Slide Agglutination Test)** أو ضمن أنبوب **(Tube Agglutination test)**

يمن لاختبار التراص أن يحدد عيار الأضداد (معايرة نصف كمية) ويتم ذلك بتحضير سلسلة تمديد من مصل المريض ثم إضافة كمية ثابتة من المعلق الجرثومي (المستضد) إلى كل تمديد ومن ثم

ملاحظة التحوصب. حيث يكون عيار الأضداد في مصل المريض هو التمديد الأكبر الذي يعطي تفاعل إيجابي (تحوصب).



وحتى يكون الاختبار مرئي بالعين المجردة يجب ان تكون كمية الأضداد مكافئة لكمية المستضدات. إذا وضعنا كمية من المستضدات ومصل المريض يحوي كمية كبيرة من الأضداد ينتج لدينا تحوصب لكن يبقى لدينا كمية من الأضداد لم ترتبط بالمستضدات وأخفت التحوصب لذلك أحياناً نضطر لتمديد المصل. ولمعرفة عيار الأضداد نضرب بنسبة التمديد ، وهذا ما يدعى بظاهرة المنطقة.

أهم تطبيقات هذا الاختبار:

اختبار فيدال لWidal test للكشف عن السالمونيلا:

اختبار كشف وتحديد عيار أضداد السلمونيلا Salmonella في مصل مرضى الحمى التيفية والحمى نظيرة التيفية. يتم باستخدام معلقات جرثومية تحمل أنواع مختلفة من المستضدات.

بما أن جرثومة السلمونيلا متحركة فإن لها نوعين من المستضدات:

مستضد جسمي: نرمز له بـ O

مستضد سوطي: يختلف رمزه باختلاف نوع السلمونيلا حيث له ثلاثة أنواع:

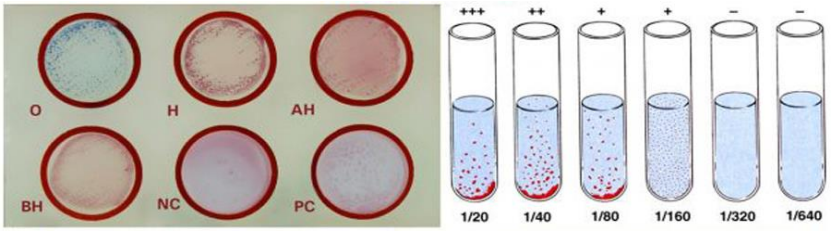
السلمونيلا التيفية العادية (S.typhi) ونرمز للمستضد السوطي هنا H.

السلمونيلا نظيرة التيفية A (S.paratyphi A) ونرمز للمستضد السوطي هنا A.

السلمونيلا نظيرة التيفية B (S.paratyphi B) ونرمز للمستضد السوطي هنا B .

طريقة العمل (على صفيحة)

في طريقة الأنابيب: يؤخذ مصل المريض ويمدد بنسب 10/1، 20/1، 40/1، 80/1، 160/1، 320/1 ونضيف لها كمية ثابتة من المستضدات، وأكبر تمديد يحصل هنا يحصل عند تحوصب هو عيار الأضداد، فمثلاً الأنابيب ذوات التمديد 20/1، 40/1، 80/1، 160/1 حصل فيه تحوصب كما في الشكل والأنبوب 320/1 لم يظهر التحوصب يكون عيار الأضداد 160/1 لأنه أعلى تمديد حصل فيه تحوصب. ولكن هذه الطريقة تحتاج إلى عدد كبير من الأنابيب وإلى وقت طويل لذا نستخدم طريقة الصفيحة.



1. قم برسم خمس دوائر على صفيحة زجاجية نظيفة

2. باستخدام الممص المناسب قم بإضافة الكميات التالية من مصل المريض إلى الدوائر المناسبة مع الترقيم: 0.08ml; 0.04ml; 0.02ml; 0.01ml; 0.005ml

3. قم بإعادة الخطوة 2 مع مصل إيجابي وآخر سلبي

4. قم بإضافة قطرة واحدة من كل من المستضدات المعلومة إلى جانب عينة المصل على الصفيحة (يجب رج المعلقات المستضدية قبل الاستخدام)

5. قم بمزج المستضد مع المصل باستخدام قطعة خشبية أو بلاستيكية مناسبة

6. قم بتدوير الصفيحة وراقب ظهور أي تحوصب

قراءة وتفسير النتائج

نقوم باختيار أعلى تمديد يعطي تحوصب

حجم المصل/مل	التمديد الموافق لاختبار التراص في أنبوب
0.08	1:20
0.04	1:40
0.02	1:80
0.01	1:160
0.005	1:320

القيمة التي تحدد وجود إصابة عندها هي إذا كان عيار الأضداد ≤ 80/1 (أي 80/1، 320/1/160/1). وظهور تحوصب مع واحد من المستضدات عند هذه القيم تكون الإصابة موجودة.

اختبار رايت Wright test للكشف عن البروسيلا:

اختبار كشف وتحديد عيار أضداد البروسيلا Brucella في مصل المريض. وهي عصيات سلبية غرام غير متحركة لذلك تحوي مستضد جسمي فقط وليس لها مستضد سوطي، تنتقل للإنسان عن طريق الحليب ومشتقاته غير المغلي المأخوذ من حيوان مصاب، تدخل عن طريق الجهاز الهضمي ومنه للجهاز الشبكي البطاني مسببة حمى تدعى الحمى المالطية.

للبروسيلا نوعين البروسيلا المجهضة ويرمز للمستضد الجسمي A والبروسيلا المالطية ويرمز للمستضد الجسمي M. يتم استخدام معلقات جرثومية للنمطين المصليين: *B. abortus, B. meletensis.*

يجرى الاختبار إما بسلسلة الأنابيب أو على صفيحة وهو الأشيع.

باتباع نفس اختبار فيدال، ولكن هنا ممكن أن تكون عيار الأضداد عال، فإذا كانت النتيجة سلبية وعند الطبيب شك أن الإصابة بروسيلا يطلب من المريض إعادة الاختبار ولكن بتمديد المصل 100 مرة وممكن أن تصل إلى 1000 مرة ثم إجراء الاختبار بالمصل الممدد باتباع الخطوات نفسها، ونضرب بعدها بنسبة التمديد.

اختبار ASLO للكشف عن العقديات المقيحة.

هو اختبار تراص على صفيحة، يستخدم لكشف وتحديد عيار أضداد Anti-Streptolysin O (ASO) في مصل المريض. يتم باستخدام جزيئات اللاتكس Latex التي تحمل المستضد Streptolysin O النوعي للمكورات العقدية المقيحة *Streptococcus pyogenes*.

طريقة العمل:

1. قم بإضافة 50µl من مصل المريض وقطرة من كل من المصل الإيجابي والمصل السلبي إلى الدوائر المرسومة على الصفيحة المرافقة:

2. أضف قطرة واحدة (50µl) من كاشف ASO-Latex (latext coated with Streptolysin O) إلى جانب كل من القطرات الثلاث الموجودة على الصفيحة (يجب رج الكاشف قبل الاستخدام)

3. قم بمزج الكاشف مع المصل باستخدام قطعة خشبية أو بلاستيكية مناسبة

4. قم بتدوير الصفيحة وراقب ظهور أي تحوصب

قراءة وتفسير النتائج

- ظهور تحوصب يشير إلى أن تركيز ASO في مصل المريض يساوي أو أكثر من 200IU/ml، وهذا يدل على إصابة حديثة وتحتاج إلى علاج.
- عياري الأضداد أقل من 200 وحدة دولية، لا توجد إصابة وممكن أن يكون تعرض سابق للجرثومة.

القسم العملي

المواد والأدوات

طاقم تجاري لاختبار ASO، صفائح زجاجية، معلقات مستضدية للسلمونيلا، معلقات مستضدية للبروسيلا، مصول إيجابية، مصول سلبية، مصول مرضية، أعواد خشبية أو بلاستيكية.

- استخدام اختبار التراص لتحديد عيار أضداد السلمونيلا والبروسيلا في عينات من المصول

- استخدام اختبار التراص (ASO) لكشف وجود أضداد المكورات العقدية المقيحة في عينة مصل

تعداد الجراثيم
(Bacterial Counting)

يعتبر تحديد عدد الجراثيم في عينة ما، من الاختبارات الروتينية اليومية في المخبر الجرثومي خاصةً فيما يتعلق بالفحص الجرثومي للماء، الأطعمة، والحليب واللبن وغيرها من المنتجات الغذائية، بالإضافة إلى عينة البول.

الطريقة الأكثر استعمالًا في تعداد الجراثيم هي:

عد الخلايا الحية (Standard, Viable Plate Count Method)

تقيس هذه الطريقة الجراثيم الحية فقط، وتتم بتحضير سلسلة من التمديدات للمعلق الجرثومي أو المنتج الغذائي باستخدام مصل فيزيولوجي أو المرق المغذي ثم الزرع على وسط من الآغار المغذي الصلب. بعد الحضن فإن كل خلية جرثومية حية سوف تعطي مستعمرة واحدة وبالتالي يتم تحديد عدد الجراثيم في العينة الأصلية بتحديد عدد المستعمرات المعزولة (Colony Forming Unit (CFU)) مع الأخذ بعين الاعتبار عملية التمديد.

يجري زرع الجراثيم على الوسط الزرعي الصلب بإحدى طريقتين:

طريقة الصب Pour-plate Count

يضاف 1 مل من المعلق الجرثومي من كل من التمديدات الأربعة الأخيرة إلى الأغار المغذي بالدرجة 55°C ثم يصب المزيج في أطباق بتري ويترك ليتصلب. بعد الحضن بالدرجة المناسبة يتم اختيار التمديد (الطبق) الذي أعطى ما بين 30-300 مستعمرة **colony-forming units (CFUs)** ويحسب عدد الجراثيم في 1مل من العينة الأصلية (غير الممددة).

تركيز الجراثيم في العينة (CFU/ml) = عدد المستعمرات * عامل التمديد

طريقة العد على السطح Spread (surface) Plate Count

بعد تحضير التمديدات، تؤخذ كمية محددة 5-10 ميكرولتر من كل من التمديدات وتزرع على وسط الآغار المغذي الصلب. بعد الحضن بالدرجة المناسبة يتم اختيار التمديد (الطبق) الذي أعطى ما بين 30-300 مستعمرة **colony-forming units (CFUs)** وحسب عدد الجراثيم في 1مل من العينة الأصلية (غير الممددة).

تركيز الجراثيم في العينة (CFU/ml) = عدد المستعمرات *عامل تصحيح الحجم*عامل التمديد

عد الجراثيم في عينة البول:

يوجد في المجاري البولية جراثيم طبيعية موجودة فقط بالإحليل لأن المثانة والكلية والحالب عقيمة، كما يعد البول سائل عقيم داخل المثانة على أن يصل إلى الاحليل الحاوي على الزمرة الجرثومية الطبيعية. البول هو العينة الحيوية الوحيدة التي يتم زرعها بشكل كمي، فإذا كانت تعداد الجراثيم أكبر من حد معين في العينة نقول أنه يوجد انتان وبحاجة للمعالجة.

في حالة كان تعداد الجراثيم أقل من 10^5 CFU/ml لا يجرى اختبار التحسس

أما إذا كان تعداد الجراثيم أكثر من 10^5 CFU/ml يجرى اختبار التحسس

الفحص الجرثومي لمياه الشرب Bacterial Examination of Potable Water

تعتبر مراقبة سلامة مياه الشرب من الأمور المهمة في الصحة العامة، حيث يمكن لماء الشرب الملوث بمياه الصرف الصحي أن ينقل عدداً كبيراً من الإنتانات الجرثومية التي يكون مصدرها فضلات البشر (البراز) كما في الشيغيلا، الحمى التيفية، الكوليرا...

نظراً لقلة عدد هذه الجراثيم الممرضة الملوثة في ماء الشرب فإن عزلها وتحديد هويتها يعتبر صعباً، ولكن يمكن قياس تلوث مياه الشرب بهذه الجراثيم الممرضة من خلال تحديد عدد جراثيم غير ممرضة، مصدرها الأساسي فضلات البشر، تتواجد عادةً في مياه الصرف الصحي بأعداد كبيرة، وتبقى حية لفترات طويلة تسمح بعدها. هذه الجراثيم تسمى الجراثيم المشعرة (Indicators) حيث يدل وجودها في مياه الشرب على التلوث بالصرف الصحي. أهم هذه الجراثيم التي تنطبق عليها المواصفات السابقة الإيشريشيا القولونية (*E.coli*) وهي أحد جراثيم الكوليفورم (Coliform group bacteria). يستخدم كشف وجود والتعداد العام لهذه الجراثيم في تحديد وقياس تلوث مياه الشرب بالصرف الصحي ويتم ذلك باستخدام عدة طرق:

1. العدد الأكثر احتمالية Most Probable Number (MPN)
2. عد الخلايا الحية (عد العيوش)
3. العد على سطح مرشحة غشائية Membrane Filter Technique (MF)

ستؤخذ هذه الطرق بالتفصيل في المقرر القادم الميكروبيولوجيا صيدلية .

القسم العملي

الكواشف والأدوات

أنابيب اختبار تحوي الأغار بالحالة السائلة بدرجة حرارة 48-50°C في حمام مائي، معلق جرثومي مجهول التركيز، أنابيب اختبار تحوي مرق مغذي، ممصات مناسبة، لهب، أطباق بتري فارغة، أطباق آغار مغذي، عينة بول.

ملخص الجلسة العملية

استخدام طريقة العد على السطح (Surface-count plate) لتحديد عدد الجراثيم في معلق جرثومي

استخدام طريقة الصب (Pour-plate) لتحديد عدد الجراثيم في معلق جرثومي.

خطوات العمل:

طريقة عد الخلايا الحية (عد العيوش) من معلق جرثومي

تحضير سلسلة التمديد Preparation of Ten-Fold Dilutions

1. قم بعنونة 7 أنابيب نظيفة من 1-7 والتي ستمثل التمديدات التالية من 10^{1-}- 10^{-7}.

2. باستخدام التقنية العقيمة (Aseptic Technique)، قم بتحضير التمديد الأول وذلك بنقل 1مل من المعلق الجرثومي إلى 9مل ممدد (مصل فيزيولوجي أو مرق مغذي) امزج جيداً، هذا موافق للتمديد الأول 10^{-1}

3. قم بتحضير التمديد الثاني وذلك بنقل 1مل من التمديد الأول إلى 9مل ممدد، امزج جيداً، هذا موافق للتمديد 10^{-2}

4. أعد خطوة التمديد خمس مرات للحصول على التمديدات التالية

10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}

طريقة الصب Pour-plate

1. قم بنقل 1مل من التمديد الرابع 10^{-4} (بعد المزج الجيد للأنبوب) إلى طبق بتري فارغ ونظيف (معنون ومرقم)

2. كرر الخطوة السابقة مع الأنابيب الثلاثة الأخيرة 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} (لا تنسى العنونة والترقيم)

3. قم بصب الآغار السائل، الموجود بالدرجة 48-50°C في الحمام المائي، في طبق بتري الموافق للتمديد الرابع، امزج مباشرةً بشكل لطيف

4. كرر الخطوة السابقة مع الأطباق التالية

5. بعد تصلب الآغار قم بقلب أطباق بتري والحضن لليوم التالي بدرجة 37ºC

طريقة العد على السطح Surface-count plate

1. قم بتحضير سلسلة التمديد كما هو موضح مسبقاً

2. باستخدام ممص مناسب (micropipette) قم بإضافة 5µl من كل من التمديدات الأربعة الأخيرة إلى طبق أغار مغذي صلب أو منطقة من طبق الأغار المغذي الصلب (يمكن تقسيم الطبق إلى أربع أرباع)

3. انتظر حتى تجف القطرات (Spots)، قم بقلب الأطباق وحضنها بدرجة 37ºC