علم التطفل والطفيليات

القسم العملي

السنة: الثالثة

القسم: علم الحياة الحيوانية

الاختصاص: الأحياء الدقيقة

منشورات جامعة دمشق
كلية العلوم

علم التطفل والطفيليات

(القسم العملي)

الدكتورة سمر النحاس
أستاذة في قسم علم الحياة الحيوانية

الدكتورة مها شعبان
مدير أعمال في قسم علم
الحياة الحيوانية

رابعة خطاب
مشرفة على الاعمال في قسم علم
الحياة الحيوانية

جامعة دمشق

١٤٣٩ - ١٤٤٠هـ
٢٠١٧ - ٢٠١٨م

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

فهرس المحتويات

المقدمة 7

الباب الأول: الأخماج الطفيلية

الفصل الأول: تشخيص الأخماج الطفيلية المعوية 11

الحصول على العينات ومعالجتها 14

دراسة بعض الأنواع الطفيلية 39

الفصل الثاني: تشخيص الأخماج الطفيلية الدموية 63

الحصول على العينات ومعالجتها 63

دراسة بعض الأنواع الطفيلية 73

الفصل الثالث: تشخيص الأخماج الطفيلية الرئوية والعصبية والبولية–التناسلية 85

أولاً: الأخماج الطفيلية الرئوية 85

ثانياً: الأخماج الطفيلية العصبية 94

ثالثاً: الأخماج الطفيلية البولية – التناسلية 101

الباب الثاني: الأخماج الجرثومية

الفصل الأول: الحصول على العينات المرضية واستنباتها 107

أولاً: الحصول على العينات المرضية 107

ثانياً: أوساط الاستنبات 110

ثالثاً: الاستنبات وأشكال المستعمرات الجرثومية 113

الفصل الثاني: طرق التلوين 123

الفصل الثالث: طرق التحاليل الكيميائية الحيوية (الاختبارات التفريقية) 145

الباب الثالث: التشخيص المناعي المصلي للأخماج

الفصل الأول: الاختبارات المصلية 165

المصطلحات العلمية 195
المراجع الأجنبية 211

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

المقدمة

قمنا بوضع هذا الكتاب وفق مفردات المنهاج العملي ليُتمّم ما ورد في القسم النظري من مقرر التطفل والطفيليات الذي يُعد من المقررات الهامة والأساسية لدراسة الأخماج التي يمكن أن تصيب الإنسان والحيوان، والذي يُدرّس لطلاب السنة الرابعة (حيوية كيميائية) والسنة الثالثة (أحياء دقيقة)، عسى أن يستفيد منه طلابنا الأعزاء ويكون عوناً لهم في دراستهم التطبيقية.

فقد اعتمدنا فيه السلاسة والبساطة في عرض معظم المواضيع المتعلقة بطرق جمع أنواع العينات كافة (برازية، دموية، قشع....الخ)، ومعالجتها وتحضيرها وتلوينها تمهيداً لدراستها وفحصها مجهرياً. بعد ذلك يجري التعرف على الطفيليات بالاستعانة بالأشكال والصور الإيضاحية، وكذلك دراسة صفات الجراثيم الشكلية والكيميائية وتحديد نوعيتها بالاستناد إلى الصور الإيضاحية المرافقة. كما تطرقنا إلى ذكر بعض الاختبارات المصلية التي يمكن الاعتماد عليها في الدراسة العملية والتشخيصية الداعمة أحياناً للطرق التقليدية.

وقد حرصنا على أن تكون معظم النماذج منتقاة من البيئة المحلية مما يساعد بصورة افضل على تفهمها واستيعابها بصورة أفضل. كما تطرقنا إلى ذكر بعض الأمثلة القليلة عن أهم الكائنات الحية الخامجة المنتشرة عالمياً في محاولة لإعطاء الطالب فكرة عنها. آملين أن نكون قد وفقنا في عرض المعلومات المفيدة والمهمة عن العديد من الطرائق المخبرية لتكون عوناً لطلابنا الأعزاء في حياتهم العملية بعد تخرجهم.

والله ولي التوفيق.....

دمشق 1439هـ/ 2018 م

المؤلفون

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الباب الأول

الأخماج الطفيلية

Parasitic infections

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الأول

تشخيص الأخماج الطفيلية المعوية

Intestinal Parasitic Infection Diagnosis

يعتمد تشخيص الإصابات الطفيلية المعوية على الاختبارات المخبرية المطبقة على العينات المدروسة والتي من خلالها يُشاهد الطفيلي (أتاريف trophozoites، أكياس cysts، بيوض eggs، يرقات larva) ويُميز بشكل جيد، وقبل إجراء التشخيص، لا بد من التعرف على بعض النقاط المهمة المتعلقة بكيفية جمع العينة والوقت المناسب لجمعها وكيفية معالجتها.. إلخ، لذلك سيتم استعراض التقانات المخبرية اللازمة لتحضير العينة للكشف عن الطفيليات التي تتبع لوحيدات الخلية Protozoa، والديدان المنبسطة Platyhelminthes، والممسودات Nemathelminthes وغيرها.

يبيّن الجدول (1) أنواع الطفيليات وأماكن تطفلها عند المضيف والطرق المقترحة للحصول على العينة من أجل فحصها ودراستها.

جدول 1: أسماء بعض أنواع الطفيليات ومكان تطفلها عند المضيف وطريقة الحصول عليها

اسم الطفيلي *	مكان التطفل	خيارات الحصول على العينة
المتكيسة الرئوية *Pneumocystis carinii* المتورقة الرئوية *Paragonimus westermani*	الرئة	قشع – السائل الرئوي خزعة
ليشمانية دونوفاني *Leishmania donovani*	نقي العظم	بزل النقي

المتصورات *Plasmodium sp.* البابيزيا *Babesia sp.* ليشمانية دونوفاني *Leishmania donovani* المقوسة القندية *Toxoplasma gondii* المثقبيات *Trypanosoma sp.* خيطيات دقيقة Microfilariae	كريات دم حمراء كريات دم بيض بلاسما الدم	دم كامل مع أو بدون مانع تخثر
الليشمانية *Leishmania sp.* الخيطيات الدقيقة *Microfilariae*	الجلد	كشاطة جلدية رشافة من تحت سطح التقرح خزعة
المتحولة *Acanthamoeba*	العين	كشاطة من القرنية خزعة من القرنية
الشريطية المسلحة *Taenia solium* المشوكة *Echinococcus sp.* النيجلاريا *Naegleria fowleri* المتحولة *Acanthamoeba* المتحولة *Hartmanella sp.*	الجهاز العصبي المركزي	السائل الدماغي الشوكي

المتقبيات *Trypanosoma sp.* المقوسة القندية *Toxoplasma gondii*		
المتحولة الزحارية *Entamoeba histolytica* المتحولة القولونية *E. coli* المتحولة الهارتمانية *E. hartmanni* المتحولة البوتشيلية *Iodamoeba butschlii* الجيارديا المعوية *Giardia lamblia* المتحولة الهشة *Dientamoeba fragilis* المشعّرة البشرية *Trichomonas hominis* البوغيات *Cryptosporidium sp.* متماثلة الأبواغ الجرسية *Isospora belli* حيات البطن *Ascaris lumbricoides* السرميةالدويدية *Enterobius vermicularis* الاسطوانية البرازية *Strongyloides stercoralis* شعرية الرأس *Trichuris trichiura* المحرشفة القزمة *Hymenolepis nana* الشريطية العزلاء *Taenia saginata*	القناة الهضمية القناة الهضمية	عينة برازية بزل (محتوى العفج) خزعة شريط اللاصق (ديدان الحرقص) محلول ملحي أو كحول 70% (ديدان بالغة أو حلقات) عينة برازية بزل (محتوى العفج) خزعة شريط اللاصق (ديدان الحرقص)

الشريطية المسلحة *Taenia solium* العوساء العريضة *Diphyllobothrium latium* متفرعة الخصية *Clonorchis sinensis* المنشقات *Schistosoma sp.*		محلول ملحي أو كحول %70 (ديدان بالغة أو حلقات)
المشوكات *Echinococcus sp.* المتحولة الزحارية *Entamoeba histolytica* ليشمانية دونوفاني *Leishmania donovani*	الكبد والطحال	بزل خزعة
الشريطية المسلحة *Taenia solium* الشعرينة الحلزونية *Trichinella spiralis* كلابية الذنب *Onchocerca volvulus*	العضلات	خزعة

الحصول على العينات ومعالجتها

أولاً: العينات البرازية

1- الحصول على العينة

تتميز بيوض الطفيليات بقدرتها على مقاومة تغيرات الوسط المحيط، في حين تكون الأشكال الناشطة أو أتاريف وحيدات الخلية هشة تتخرب بسرعة خاصة عند حدوث تلوث في العينات، أو تبدل في درجة الحرارة، أو بسبب عدم القدرة على دراسة العينة وفحصها مباشرة بعد الحصول عليها؛ لذلك لا بد من أخذ الحيطة والحذر عند فحص العينة المشكوك باحتوائها أحد أنواع وحيدات الخلية الطفيلية.

وللحصول على عينة برازية stool sample قابلة للدراسة، يُنصح باستعمال أوعية بلاستيكية نصف شفافة نظيفة ومانعة للتسرب ذات فتحة واسعة ومزودة بغطاء محلزن. ويجب أن تكون الأوعية جافة تماماً؛ لأن وجود أي آثار من الماء أو البول أو أي مادة أخرى يؤدي من جهة إلى تمديد العينة، ومن جهة أخرى إلى موت الطفيليات أو تشويه شكلها الخارجي في حال وجودها (خاصة الأشكال الناشطة لوحيدات الخلية). يُرفق مع العينة اسم صاحبها، تاريخ وزمن الجمع بالإضافة إلى بيانات متعلقة بتناول أدوية (صادات حيوية، مضادات إسهال، ملينات معوية....إلخ) أو إجراء تصوير شعاعي باستعمال زيوت معدنية أو مركبات الباريوم وغيرها، قبل شهر على الأقل من تاريخ الجمع.

إن استعمال أحد هذه المواد يُؤثر في نتيجة الفحص، وبالتالي لا بد من تأجيل الحصول على العينة لمدة تتراوح بين أسبوع و ثلاثة أسابيع بعد إيقاف تناولها (أسبوع بالنسبة لأملاح الباريوم barium salts أو البزموت bismuth salts، وأسبوعين بالنسبة للصادات الحيوية antibiotics وثلاثة أسابيع في حالة التصوير الإشعاعي)، كما يُنصح أيضاً عند استعمال المطهرات المعوية بأخذ العينة بعد إيقاف تناولها من 3 إلى 4 أسابيع عند الكشف عن وحيدات الخلية، ومن أسبوع إلى أسبوعين عند الكشف عن الديدان (قد تمتد هذه الفترة إلى ستة أسابيع بالنسبة للشريطيات). بعد الحصول على العينة البرازية، يتم نقلها مباشرة إلى المختبر لفحصها خلال مدة تتراوح بين 2 و 4 ساعات من زمن الجمع. وفي حال عدم التمكن من ذلك، يُنصح بحفظ العينة إما في الثلاجة لمدة يومين تقريباً (تحافظ الحرارة المنخفضة 4C° + على سلامة الطفيليات على الرغم من فقدانها لنشاطها الحركي خاصة بالنسبة للأشكال الناشطة لوحيدات الخلية) أو لمدة طويلة باستعمال أحد أنواع المثبتات والمواد الحافظة المذكورة في الجدول (2).

جدول 2: المثبتات والمواد الحافظة للعينة البرازية

المثبت – المادة الحافظة	المزايا	المساوىء
فورمالين 10% 10% Formalin	1- يستعمل لتثبيت كل العينات. 2- سهل التحضير 3- صلاحيته لفترة طويلة. 4- يحفظ جيداً الشكل المورفولوجي لبيوض الديدان واليرقات وأكياس المتحولات والأكريات. 5- مناسب لطرق التكثيف. 6- مناسب لاستعمال الملونات: acid fast, safranin & chromotrope. 7- ملائم لكواشف المقايسة المناعية والتألق المناعي.	1- غير مناسب لعمل محضرات دائمة وملونة بملون trichrome. 2- لا يحفظ جيداً الشكل المورفولوجي للأشكال الناشطة لوحيدات الخلية. 3- يمكن أن يتداخل مع تفاعل سلسلة البوليميراز PCR خاصة عند تمديد فترة التثبيت.
ميرثيولات – إيودين– فورم الدهيد Merthiolate–Iodine–Formaldehyde (MIF)	1- يساهم في تثبيت وتلوين الكائنات الحية. 2- سهل التحضير. 3- صلاحيته لمدة طويلة. 4- يفيد في الاستقصاء الحقلي. 5- مناسب لطرق التكثيف.	1- غير مناسب لعمل محضرات دائمة وملونة بملون trichrome. 2- لا يحفظ جيداً الشكل المورفولوجي للأشكال الناشطة لوحيدات الخلية. 3- يتداخل الإيودين مع الملونات الأخرى والمواد المتألقة. 4- يمكن أن يسبب الإيودين تشوهاً لوحيدات الخلية.
كحول – بولي فينيل	1- يحفظ جيداً الشكل	1- لا يحفظ جيداً الشكل

polyvinyl-alcohol (PVA)	المورفولوجي لنواشط وأكياس وحيدات الخلية. 2- يلعب دوراً في حفظ الكائنات الحية وفي لصقها على الصفيحة المجهرية من أجل التلوين. 3- مناسب لعمل محضرات دائمة وملونة بملون trichrome. 4- بقاء العينات المحفوظة فيه ثابتة عدة أشهر.	المورفولوجي لبيوض الديدان واليرقات وأكياس المتحولات والأكريات. 2- يحوي كلور الزئبق. 3- التخلص منه صعب. 4- صعب التحضير في المختبر. 5- غير مناسب لطرق التكثيف. 6- لا يمكن استخدامه مع كواشف المقايسة المناعية. 7- غير مناسب للملونات: acid fast, safranin & chromotrope.
أسيتات الصوديوم-حمض الخل-فورمالين sodium acetate-acetic acid-formalin (SAF)	1- مناسب لطرق التكثيف ولتحضير محضرات دائمة ملونة. 2- سهل التحضير. 3- صلاحيته لمدة طويلة. 4- مناسب لاستخدام الملونات: acid fast, safranin & chromotrope. 5- ملائم لكواشف المقايسة المناعية.	1- يحتاج إلى مادة إضافية (albumin-glycerin) للصق العينة على الصفيحة المجهرية. 2- التلوين الدائم غير جيد.
مثبت شودين Fixative Schaudinn's	يحافظ جيداً على الشكل المورفولوجي لنواشط وأكياس وحيدات الخلية، وهو مناسب لعمل محضرات دائمة وملونة.	لا يناسب كثيراً طرق التكثيف. يحوي كلور الزئبق. لا يحفظ جيداً الشكل المورفولوجي لبيوض الديدان واليرقات وأكياس المتحولات والأكريات.

2- الفحص المجهري للبراز

يؤدي الفحص المجهري دوراً رئيساً في تشخيص الإصابات الطفيلية عن طريق الكشف عن وحيدات الخلية (أشكال ناشطة trophozoites، أكياس cyst، بيوض كيسية Oocysts) والديدان (بيوض eggs، يرقات larva).

2-1- تحضير العينة الرطبة للفحص المباشر:

يُستعمل في تحضير العينة الرطبة إما عينة برازية حديثة الجمع أو عينة مثبتة ومحفوظة بأحد المثبتات المذكورة سابقاً (كالفورمالين 10%).

يُنصح في حالة العينة البرازية حديثة الجمع أن يجري الفحص بسرعة وبدون تأخير لرؤية الأشكال الناشطة المتحركة (خلال 30 دقيقة من زمن جمع العينة السائلة "غنية بالأشكال الناشطة"، وساعة من زمن الحصول على العينة الطرية "تحوي أشكال ناشطة وأكياس"). وفي حال عدم التمكن من إجراء الفحص مباشرة يُضاف إلى العينة مادة حافظة لمنع تخرب الكائنات الموجودة فيها كما يمكن تأخير فحص العينة الصلبة (أشكال ناشطة نادرة الوجود) لمدة يوم أو يومين شريطة وضعها في الثلاجة. عند وصول العينة البرازية إلى المختبر، يتم إجراء الخطوات الآتية:

- تُجهز عينتان للفحص المباشر على صفيحة زجاجية واحدة أو على صفيحتين منفصلتين.
- توضع على الصفيحة الأولى قطرة من محلول ملحي وعلى الثانية قطرة من الماء اليودي أو ما يُعرف باسم ملون لوغول Lugol's stain .
- يوضع فوق كل قطرة كمية صغيرة من العينة البرازية (2 ملغ تقريباً) باستعمال عود بلاستيكي أو خشبي ومن ثمّ تُمزجان جيداً للحصول على قطرة متجانسة كبيرة الحجم نسبياً.
- تُغطى كل قطرة بساترة زجاجية (الانتباه لعدم تشكل فقاعات هوائية) تمهيداً لفحصها مجهرياً أولاً بالتكبير الضعيف (×10) ثمّ بالتكبير القوي (×40).

ولا بد من الإشارة إلى عدم إمكانية استعمال العدسة الغاطسة على الإطلاق في فحص العينة الرطبة إلاّ إذا تمّ إغلاق كافة حواف الساترة بمادة (مزيج من: البارافين والفازلين

(V:V) المسخن للدرجة 70 مئوية من أجل الذوبان) تحمي العينة من الجفاف وتمنع تبعثرها خارج محيط الساترة.

يساعد فحص القطرة الرطبة الملونة بمحلول لوغول على تأكيد التشخيص والتمييز النوعي للكائنات المشكوك بها، شريطة أن تكون نسبة اليود في المحلول ضعيفة. لأنّ التركيز المرتفع لليود يؤثر في محتوى القطرة الذي يصبح داكناً مما يعيق عملية التشخيص.

2-2- طرائق التكثيف concentration methods:

تساهم طرق التكثيف من جهة في فصل أكياس الطفيليات الأوالي وبيوض الديدان عن مخلفات (بقايا) العينة البرازية، ومن جهة أخرى في زيادة فرصة مشاهدة الكائنات الطفيلية عندما تكون بأعداد قليلة. يُعرف نوعان من طرق التكثيف: التعويم flotation method، والترسيب sedimentation method.

آ- التعويم flotation:

تعتمد هذه الطريقة على مزج العينة البرازية بمحلول (مثل: كبريتات التوتياء $ZnSO_4$ أو محلول سكري) ذي وزن نوعي أكبر من الوزن النوعي لجميع الأشكال الطفيلية المحتمل وجودها ضمن العينة. تساعد هذه الطريقة في الحصول على عينة نظيفة من الطفيليات (أكياس وحيدات الخلية وبيوض الديدان) التي تطفو على سطح سائل التعويم في حين تتوضع مخلفات (بقايا) العينة البرازية في الأسفل إلى جانب بعض أنواع البيوض الثقيلة (كالبيوض الغطائية والبيوض غير المخصبة لحيات البطن).

*** التعويم باستعمال المحلول السكري:**

تحضير المحلول السكري:

- وضع 320 مل ماء في وعاء سعة ليتر على سخان وخلاط مغناطيسي.
- إضافة 500 غ سكروز ببطء إلى الماء مع التسخين والتحريك المستمر.
- إضافة 6.5 غ من الفينول مع استمرار التحريك للحصول أخيراً على محلول عديم اللون.

خطوات العمل:

- وضع كمية من العينة البرازية (2–3 غرام) في محلول ملحي ومزجهما جيداً.
- ترشيح المزيج باستعمال الشاش على أنبوب تثفيل سعة 15 مل، ومن ثمّ التثفيل لمدة 2 دقيقة على السرعة 2000 دورة/الدقيقة (450 – 500 g).
- بعد التخلص من السائل الطافي، يُضاف المحلول السكري (مع مراعاة ترك حوالي 2 سم من الأنبوب فارغاً) ويُمزج جيداً مع الراسب عن طريق قلب الأنبوب عدة مرات بعد إغلاق فوهته بسدادة.
- إضافة كمية إضافية من المحلول السكري إلى الأنبوب (مع مراعاة ترك حوالي 3– 5 ملم من الأنبوب فارغاً) ومن ثمّ التثفيل لمدة 2 دقيقة على السرعة 2000 دورة/الدقيقة.
- وضع سائرة زجاجية على سطح الأنبوب والتأكد من ملامستها لسطح السائل، وتركها لمدة 8 دقائق.
- قلب السائرة (بعد إزالتها) على صفيحة زجاجية مجهرية تمهيداً لفحصها مجهرياً.

*** التعويم باستعمال كبريتات التوتياء:**

تحضير محلول كبريتات التوتياء:

حل 330 غ كبريتات التوتياء في 600 مل ماء مقطر ساخن، بعد تمام الانحلال يستكمل الحجم إلى 1000مل بالماء المقطر، يجب أن تكون الكثافة النوعية للمحلول الناتج 1.18 (تُعدل الكثافة عن طريق إضافة الماء أو كبريتات التوتياء عند الحاجة).

خطوات العمل:

- مزج كمية من العينة البرازية (ربع إلى نصف ملعقة صغيرة أو أكثر إذا كانت العينة سائلة) مع الماء المقطر (من 10 إلى 15 مل) في أنبوب اختبار.
- ترشيح المزيج باستعمال الشاش على أنبوب تثفيل سعة 15 مل، ومن ثمّ إضافة الماء المقطر (مع مراعاة ترك حوالي 2 سم من الأنبوب فارغاً).

- تثفيل الأنبوب لمدة 10 دقائق على السرعة 2500 دورة/الدقيقة (650 g) ومن ثمّ إزالة السائل الطافي.
- إضافة 1.5 مل من محلول كبريتات التوتياء إلى الراسب والمزج جيداً.
- إضافة كمية إضافية من محلول كبريتات التوتياء إلى الأنبوب (مع مراعاة ترك حوالي 3 – 5 ملم من الأنبوب فارغاً) الذي يُثفّل لمدة دقيقتين على السرعة 2500 دورة/الدقيقة (650g).
- تحرر الطبقة السطحية المشتملة على الطفيليات من الأنبوب (دون تحريكه) باستعمال أداة عزل معدنية ذات نهاية حلقية (يتراوح قطر الحلقة بين 5 و 8 ملم) وتوضع على شريحة زجاجية للفحص المجهري.

ب- الترسيب sedimentation:

تعتمد طريقة الترسيب التي تتميز بسهولة تطبيقها مخبرياً على مزج كمية من العينة البرازية مع محلول ذي وزن نوعي أقل من الوزن العائد للأشكال الطفيلية المحتمل وجودها في العينة، ومن ثمّ تثفيلها للحصول على الراسب الذي يجري فحصه تحت المجهر للكشف عن الطفيليات. لتطبيق هذه الطريقة يُنصح باستعمال محلول الفورمالين – الإيتر (يثبت الفورمالين الأشكال الطفيلية التي تحافظ من جهة على شكلها الخارجي وتفقد قدرتها على العدوى من جهة أخرى، في حين يساعد الإيتر، الذي يمكن استبداله بمحلول ethyl acetate لتجنب خطورة التعامل معه، على التخلص من المخلفات أو الفضلات البرازية) على الرغم من عدم قدرته على تكثيف بيوض المحرشفة *Hymenolepis sp.* eggs أو أكياس الجيارديا *Giardia* cysts والمتحولة البوتشيلية *Iodamoeba butschlii*. وتشتمل هذه الطريقة على الخطوات الآتية:

- مزج كمية من العينة البرازية (ما يعادل 5 غ) في سائل فيزيولوجي (بنسبة 10:1) جيداً.
- ترشيح 10 مل من المزيج باستخدام مصفاة ناعمة الثقوب في أنبوب تثفيل.
- تثفيل الأنبوب لمدة دقيقة أو دقيقتين على السرعة 2500 دورة/الدقيقة.
- إزالة السائل الطافي بكامله (الانتباه إلى لون السائل، إذا كان عكراً تعاد عملية الغسل بالسائل الفيزيولوجي والتثفيل).

- إضافة 9 مل من الفورمالين 10% إلى الراسب الناتج (كميته تقريباً 1 – 1.5 مل) ومزجهما جيداً، ثم ترك الأنبوب ليهدأ مدة 5 دقائق.
- إضافة من 3 إلى 4 مل من الإيتر (أو ethyl acetate) ثم إغلاق فوهة الأنبوب جيداً بسدادة وخضه بشدة لمدة 30 ثانية.
- بعد نزع السدادة بعناية يُثقل الأنبوب لمدة دقيقة على السرعة 2000 دورة/الدقيقة حيث تتشكل 4 طبقات (الشكل 1).
- تُحرك طبقة الفضلات بعود خشبي ثمّ يُقلب الأنبوب بحرص وحذر للتخلص من السائل الطافي (الطبقات الثلاث الأولى).
- بعد إزالة ما تبقّى من الفضلات بقطعة من القطن، يمزج الراسب جيداً مع ما تبقى من السائل بطرق الأنبوب بلطف على راحة الكف.
- وضع قطرتين من الراسب على شريحة مجهرية ومزج الأولى بقطرة من السائل الفيزيولوجي، والثانية بقطرة من محلول لوغول تمهيداً للفحص المجهري على التكبيرين ×10 و ×40. عند الرغبة بحفظ الراسب لفترة زمنية طويلة، يمزج مع 1 أو 2 مل من الفورمالين 10% ويغلق الأنبوب جيداً.

الشكل 1: يبيّن مختلف الطبقات الناتجة عن تطبيق طريقة الترسيب باستعمال الفورمالين – الايتر

2-3- طرائق التلوين staining methods:

يمكن مشاهدة بيوض ويرقات الديدان وتمييزها في العينة البرازية غير الملونة بسهولة، في حين يكون هذا الأمر صعباً بالنسبة لوحيدات الخلية (أشكال ناشطة، أكياس، بيوض كيسية)، لذلك يجب تلوين العينة لتأكيد التشخيص ولتمييز الأنواع الطفيلية خاصة بالنسبة لوحيدات الخلية التي تصبح بنيتها واضحة بعد التلوين. تُعرف طرق عديدة لتلوين العينة البرازية يُستعمل فيها أنواع مختلفة من الملونات تفيد في الكشف عن الكائنات الطفيلية بأشكالها المختلفة.

آ- طريقة التلوين بـ wheatley'strichrome:

تتميز هذه الطريقة بسهولة تطبيقها، وبأنها جيدة لتلوين وحيدات الخلية المعوية والخمائر والخلايا البشرية. يمكن أن تُطبق على عينات برازية حديثة الجمع أو عينات مثبتة ومحفوظة في محلول كحول- بولي فينيل polyvinyl-alcohol (المؤلف من كحول بولي فينيل وغليسيرين و حمض الخل الثلجي ومحلول Schaudinn) أو أي محلول آخر.

تحضير الكواشف:

- محلول التثبيت Schaudinn's fixative: يُحل 110 غرام من كلور الزئبق في 1000 مل من الماء المقطر بالتسخين مع التحريك حتى الذوبان التام، ثمّ يُترك المحلول ليبرد.
- المحلول الأم: يُمزج 600 مل من محلول كلور الزئبق المشبع مع 300 مل من الإيتانول 95%.
- محلول العمل: يحضر قبل الاستعمال مباشرة بإضافة 5 مل من حمض الخل الثلجي إلى 100 مل من المحلول الأم والمزج جيداً.
- محلول الملون Gomori's trichrome: يُخلط 600 ملغ chromotrope و 300 ملغ light green و 700 ملغ حمض الفوسفوتنغستيك، مع بعضها، ثمّ يُضاف 1 مل حمض خل ثلجي إليها، يُترك المزيج ليهدأ من 15 إلى 30 دقيقة ليُضاف إليه بعد ذلك 100 مل ماء مقطر.

- محلول كحول – إيودين: يُمزج كمية كافية من بلورات اليود مع كحول إيتيلي 70% لتحضير محلول مركز لونه بني داكن. وقبل الاستعمال مباشرة يُمدد هذا المحلول بالإيتانول 70% حتى يصبح لونه بنياً فاتحاً.

خطوات العمل:

- تحضير شرائح مجهرية من العينة البرازية (حديثة أو محفوظة) وتركها لتجف بالهواء أو بالدرجة 60 مئوية على مجفف شرائح.
- تثبيت شرائح العينة حديثة الجمع في محلول التثبيت Schaudinn's لمدة 50 دقيقة على الأقل (يتم تجاوز هذه الخطوة بالنسبة لشرائح العينة المحفوظة).
- تغطيس الشرائح المجهرية في محلول الكحول اليودي (دقيقة للعينة الحديثة و 20 دقيقة للعينة المحفوظة بـ PVA). يتم تجاوز هذه الخطوة عند استعمال عينات محفوظة في محاليل خالية من كلور الزئبق.
- تُغسل الصفائح المجهرية في حمامين متتاليين من الايتانول 70% (لمدة 5 دقائق للأول و 3 دقائق للثاني).
- تُغمر الشرائح بملون تري كروم لمدة تتراوح بين 8 و 10 دقائق.
- تُغطس الشرائح في مزيل اللون (الكحول الحامضي) لمدة 3 ثواني.
- تُغسل الشرائح بسرعة بالإيتانول 100% ومن ثم وضعها في حمامين متتاليين من الكحول 100% (لمدة 3 دقائق لكل حمام).
- توضع الصفائح في حمامين من الكزيلول (لمدة 10 دقائق لكل حمام).
- توضع قطرة من بلسم كندا على العينة وتُغطى بسائرة ومن ثمّ تُترك لتجف بالحرارة تمهيداً لفحصها مجهرياً.

يُنصح باستعمال عينة شاهدة لأحد أنواع الطفيليات المعوية كطفيلي الجيارديا المعوية *G. intestinalis*. تتلون سيتوبلاسما الشكل الناشط بالأخضر المائل إلى الزرقة وأحياناً بالبنفسجي الفاتح، في حين تأخذ سيتوبلاسما الشكل المتكيس اللون البنفسجي الداكن. أما بالنسبة للنواة والأجسام الكروماتيدية والجراثيم وغيرها فتتلون باللون الأحمر أو البنفسجي الزهري.

ب- طريقة التلوين بحمض الفوسفوتنغستيك – الحديد – الهيماتوكسيلين:
phosphotungstic acid – iron haematoxylin staining

تحضير الكواشف:

يتم تحضير كل من محلول التثبيت Schaudinn's fixative والكحول اليودي كما ورد في طريقة التلوين بملون trichrome.

- محلول مثبت اللون (4%): يُحل 4 غ من كبريتات الأمونيوم الحديدية في 100 مل ماء مقطر.
- السائل الملون (هيماتوكسيلين 5%): يُضاف 95 مل ماء مقطر إلى 5 مل من المحلول الأم (هيماتوكسيلين 10% في كحول إيتيلي 95%) للوصول إلى حجم 100 مل. يجب تحضير هذا المحلول دائماً قبل الاستعمال؛ لأنه غير ثابت.
- محلول إزالة اللون: يُحل 2 غ من حمض الفوسفوتنغستيك في 100 مل ماء مقطر.
- الكزيلول الفحمي: يُمزج حجم من الفينول مع 3 حجوم من الكزيلول.

خطوات العمل:

- بعد تحضير الشرائح المجهرية من العينة البرازية وتركها لتجف بالهواء أو بالدرجة 60 مئوية على مجفف شرائح، تُثبت في محلول التثبيت Schaudinn's لمدة 5 دقائق بالدرجة 50 مئوية أو لمدة 60 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
- توضع الشرائح في الكحول اليودي لمدة 5 دقائق، ثمّ في الإيتانول 50% لمدة 3 دقائق، وأخيراً في الماء المقطر لمدة 3 دقائق.
- تُغطس الشرائح في مثبت اللون "iron-alum" 4% لمدة تتراوح من 3 إلى 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة ثمّ تُغسل بالماء المقطر لمدة دقيقة.
- تُغمر الشرائح بملون الهيماتوكسيلين لمدة دقيقة، ومن ثمّ تُغسل بالماء المقطر لمدة دقيقة.

- تُغطس الصفائح في مزيل اللون (حمض الفوسفوتنغستيك 2%) لمدة 2 دقيقة أو أكثر.
- تُغسل الصفائح بالماء الجاري لمدة 5 دقائق، ومن ثم يُنزع الماء منها عن طريق تمريرها على حمامات من الكحول والكزيلول (كحول إيتيلي 95% و 100% لمدة 3 دقائق لكل حمام، الكزيلول الفحمي لمدة 5 دقائق، الكزيلول لمدة 3 دقائق).
- توضع قطرة من بلسم كندا فوق كل عينة وتُغطى بسائرة وتُترك لتجف في المحم أو على مجفف الشرائح تمهيداً للفحص المجهري.

تتلون الكائنات الطفيلية باللون الرمادي أو الأزرق الباهت، في حين تأخذ النواة والأجسام الكروماتيدية والجراثيم وغيرها اللون الأسود.

ج- طريقة التلوين بـ Acid-Fast المعدلة:

تفيد هذه الطريقة في تمييز البيوض الكيسية لأنواع الأكريات (كالبوغيات *Cryptosporidium* ومتماثلة الأبواغ *Isospora* و *Cyclospora*) التي تكون صعبة المشاهدة بالملونات الكلاسيكية. تطبق هذه الطريقة على عينات برازية معالجة بالترسيب ومحفوظة بالفورمالين، كما يمكن تطبيقها على عينات أخرى كسائل العفج والعصارة الصفراوية والعينات الرئوية (القشع، السائل الرئوي، الخزعات).

تحضير الكواشف:

- ملون الفوكسين الفحمي carbol fuchsin: يُحل 4 غ من الملون في 20 مل من الإيتانول 95% مع التحريك البطيء ومن ثمّ يضاف 100 مل من الماء المقطر و 8 غ بلورات الفينول المنحلة.
- محلول أزرق الميتيلين Methylene bleu: يُحل 300 ملغ من كلور أزرق الميتيلين في 100 مل من الماء المقطر (يستعمل أحياناً محلول أخضر مالاشيت Malachite green 3%: يُحل 3 غ من مركب أخضر مالاشيت في 100 مل ماء مقطر، ويحفظ في درجة حرارة الغرفة).
- مزيل اللون (الكحول الحامضي): يُمزج 10 مل حمض كبريت مع 90 مل كحول إيتيلي مطلق. يحفظ المزيج في درجة حرارة الغرفة.

خطوات العمل:

- بعد تحضير الشرائح المجهرية من العينة البرازية (يُفضل أن تكون اللطاخة رقيقة نسبياً) وتجفيفها على مجفف شرائح بالدرجة 60 مئوية لمدة 10 دقائق تقريباً، تُغمر بالميتانول لمدة 3 دقائق.
- تُغمر الشرائح بملون الفوكسين الفحمي لمدة تتراوح بين 15 و 20 دقيقة، ثمّ تغسل سريعاً بالماء المقطر وتجفف نسبياً.
- تُغمر الصفائح بمزيل اللون (الكحول الحامضي) لمدة 2 دقيقة، ومن ثمّ تُغسل بالماء المقطر وتُجفف نسبياً.
- تُغمر الصفائح إما بأزرق الميتيلين لمدة دقيقة أو بأخضر مالاشيت لمدة دقيقتين ثمّ تُغسل بالماء المقطر.
- تجفف الصفائح إما بالهواء أو على مجفف شرائح بالدرجة 60 مئوية ثمّ يوضع قطرة بلسم كندا وساترة تمهيداً لفحصها مجهرياً.

يُنصح بتلوين عينة شاهدة للبوغيات مأخوذة من عينة برازية مثبتة بالفورمالين. حيث تتلون البوغيات باللون الزهري أو الأحمر الفاتح أما خلفية العينة فتتلون باللون الأزرق أو الأخضر.

د- طريقة التلوين بـ chromotrope:

تساعد هذه الطريقة على تمييز أبواغ Microsporidia، التي يصعب تفريقها بسبب صغر حجمها عن مكونات البراز. وتطبق على عينة برازية مثبتة بالفورمالين 10%.

تحضير الكواشف:

- ملون chromotrope: يُحل 6 غ من الملون و 150 ملغ fast green و 700 ملغ حمض الفوسفوتنغستيك في 3 مل من حمض الخل الثلجي. بعد أن يهدأ المزيج لمدة 30 دقيقة يضاف إليه 100 مل من الماء المقطر. لا بد من تبديل المحلول الملون بعد كل عملية تلوين لمجموعة من الشرائح (10 شرائح تقريباً).

- مزيل اللون (الكحول الحامضي): يُمزج 995.5 مل من الإيتانول (90%) مع 4.5 مل من حمض الخل الثلجي.

خطوات العمل:

- بعد تحضير الشرائح المجهرية من العينة البرازية (يُفضل أن تكون اللطاخة رقيقة نسبياً) وتُجفف على مجفف شرائح بالدرجة 60 مئوية لمدة 5 أو 10 دقائق، تُوضع في الميتانول لمدة 5 دقائق.
- تُغمر الشرائح بالملون لمدة 90 ثانية.
- وبعد التخلص من المحلول الملون تُغطس الشرائح بسرعة في مزيل اللون لمدة 3 ثواني ثم تُغسل في الإيتانول 95% (عدة مرات).
- تُوضع الشرائح في حمامين متتاليين من الإيتانول 100% (3 دقائق لكل حمام) ثمّ في حمامين من الكزيلول (10 دقائق لكل حمام) وأخيراً تُوضع قطرة بلسم كندا وساترة تمهيداً للفحص المجهري.
- تُستعمل أثناء العمل عينة شاهدة محفوظة في الفورمالين 10% حيث تتلون أبواغ الـ Microsporidia التي يبلغ حجمها 1 ميكرون تقريباً، باللون الأحمر أو الزهري الفاتح.

هـ- طريقة تلوين Ryan's Trichrome Blue :

تفيد هذه الطريقة في رؤية أبواغ الـ Microsporidia صغيرة الحجم (كالـ *Enterocytozoon*) وتمييزها. حيث يتلون جدار البوغة بالأحمر الزهري وخلفية العينة باللون الأزرق.

تحضير الكواشف:

- ملون Trichrome Blue: يُحل 6 غ من ملون chromotrope 2R و 0.5 غ من أزرق الأنيلين و 0.25 غ من حمض الفوسفوتنغستيك في 3 مل حمض الخل الثلجي. يُترك المزيج في حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة حتى يهدأ ومن ثم يُضاف 100 مل ماء مقطر وتكون معايرة درجة حموضة المحلول النهائي (pH=2.5).

- مزيل اللون (الكحول الحامضي): يُمزج 995.5 مل من الإيتانول (90%) مع 4.5 مل من حمض الخل الثلجي.

خطوات العمل:

- بعد تحضير الشرائح المجهرية من العينة البرازية وتجفيفها جيداً بالهواء تُوضع في الميتانول لمدة تتراوح من 5 إلى 10 دقائق ثم تترك لتجف بالهواء.
- تُغمر الشرائح بالملون لمدة 90 دقيقة.
- وبعد التخلص من المحلول الملون تُغطس الشرائح بسرعة في مزيل اللون لمدة 5 ثواني ثم تُغسل في الإيتانول 95% (عدة مرات، عدة ثواني في كل مرة).
- تُوضع الشرائح في حمامين متتاليين من الإيتانول 95% (5 دقائق لكل حمام) ثمّ في الإيتانول 100% (10 دقائق) وأخيراً في الكزيلول (10 دقائق) تمهيداً لتغطيتها بساترة زجاجية بعد وضع بلسم كندا لفحصها مجهرياً.

ثانياً: الخزعات النسيجية المعوية Intestinal tissues biopsy

1- معالجة الخزعة النسيجية

يجب تثبيت الخزعة النسيجية مباشرة في الفورم ألدهيد (10%) أو في محلول البوان قبل إرسالها إلى مخبر التشريح المرضي لإجراء المقاطع النسيجية، إلاّ أنه وفي بعض الحالات التي تحتاج إلى نتيجة تشخيصية أولية سريعة (قبل إجراء الدراسة النسيجية) يجري تطبيق ما يُعرف باسم "touch preparation"، حيث تؤخذ قطعة من الخزعة قبل وضعها بالمثبت، وتمرر عدة مرات على سطح صفيحة زجاجية مجهرية نظيفة تمهيداً لتثبيتها وتلوينها من أجل الفحص والدراسة. تساعد هذه الطريقة على إعطاء فكرة مبدئية عن تشخيص الإصابة بداء الجيارديا Giardiasis والأميبات Amebiasis في الخزعة المعوية (النسيج المعوي).

2- تحضير المقاطع النسيجية

يتم اللجوء إلى عمل مقاطع نسيجية، إما للكشف عن تفاصيل البنية الداخلية للطفيلي، أو لدراسة العلاقة بين المضيف-الطفيلي والتخريب الذي يسببه الطفيلي في مكان التطفل.

تُستعمل طريقة البرافين– الهيماتوكسيلين– الإيوزين، في تهيئة الطفيليات (بحالتها الحرة أو المتطفلة داخل نسج المضيف). تشتمل هذه الطريقة على المراحل الآتية:

- تُثبت الخزعة أو الكائنات الطفيلية في محلول البوان picric acid أو الفورم ألدهيد formaldehyde (10%) لمدة ساعة أو أكثر (حسب حجم العينة).
- تُغسل العينة في حمامات متعاقبة من الكحول الإيتيلي (70%) لإزالة آثار المثبت تماماً (خاصة البوان).
- يُنزع الماء من العينة عن طريق إمرارها في حمامات من الكحول متزايدة التركيز (80 – 95– 100%) بمعدل مرتين لكل تركيز (كل حمام لمدة 5 دقائق) ومن ثم تُنقل العينة إلى الكزايلين أو الكزيلول (حتى تصبح العينة واضحة).
- تُوضع العينة في مزيج متساوٍ من الكزيلول والبرافين المنصهر، وتترك في فرن (لا تزيد درجة حرارته عن درجة انصهار البرافين)، لمدة 15 – 30 دقيقة.
- يُصب قليل من البرافين المنصهر في قوالب خاصة ويُترك ليبرد (يشكل وسادة شمعية)، ثم توضع العينة على الوسادة الشمعية ويُصب البرافين السائل حتى يغمرها تماماً.
- تُترك القوالب ليتصلب فيها البرافين تماماً، عندها يتم إخراج قالب البرافين المشتمل على العينة ويوضع على جهاز المقطاع لعمل مقاطع نسيجية بسماكة 5 ميكرومتر تقريباً تمهيداً لمعالجتها من أجل التلوين.

3- تلوين المقاطع النسيجية

تشتمل طريقة التلوين على الخطوات الآتية:

- إزالة البرافين بوضع المقاطع (المحمولة على شريحة زجاجية) في الكزيلول مدة 2 دقيقة.
- إزالة الماء من المقاطع بإمرارها في حمامات من الكحول الإيتيلي متزايدة التركيز (30، 50، 70، 95، 100%) لمدة دقيقة في كل تركيز.
- تلوين المقاطع بملون الهيماتوكسيلين الممدد في الماء المقطر (بنسبة 9:1) لمدة 15 دقيقة.

- وضع المقاطع في الكحول الحامضي (70%) حتى تتلون باللون الأحمر الزهري.
- بعد غسيل المقاطع بالكحول الإيتيلي 70%، توضع في الكحول القلوي (70%) حتى يصبح لون المقطع أزرق.
- وضع المقاطع في الكحول الإيتيلي 95% المشتمل على الإيوزين (5%) لمدة دقيقة واحدة.
- بعد غسيل المقاطع عدة مرات في الكحول 95% (لإزالة الفائض من الإيوزين) وعندما يصبح لونها قرمزياً توضع في الكحول المطلق لمدة 3 دقائق ومن ثم في الكزيلول لمدة 3 دقائق تمهيداً لتغطيتها بسائرة زجاجية بعد وضع بلسم كندا لفحصها مجهرياً.

ثالثاً: الدراسة العيانية للعينة البرازية

لا بد من تحديد طبيعة العينة البرازية وخواصها الشكلية بالعين المجردة؛ لأن ذلك يفيد في التشخيص الأولي قبل القيام بالفحص المجهري.

- **قوام البراز stool consistency:**

يمكن أن يكون لقوام البراز مظاهر مختلفة وهي:

- قوام صلب formed: يصادف فيه عادة أكياس وبيوض ويرقات بعض أنواع الطفيليات فقط.
- قوام نصف صلب semi formed (عجيني طري soft & pasty): يصادف فيه عادة أكياس الحيوانات الأوالي (النواشط بشكل عرضي)، إضافة لبيوض ويرقات بعض الديدان.
- قوام لين mild diarrhea: يُصادف فيه نواشط وأكياس الحيوانات الأوالي، إضافة لبيوض ويرقات بعض الديدان.
- قوام سائل (مائي) watery: يصادف فيه عادة الأشكال الناشطة لبعض الطفيليات وبيوض بعض الديدان، ونادراً ما تصادف الأكياس إلاّ إذا كان البراز ناجماً عن استعمال ملين قوي.

- **لون البراز stool color:**

يمكن أن يكون للبراز ألوان مختلفة وهي:

- اللون البني الطبيعي ويعود إلى وجود الستيركوبلين stercobilin وهو صباغ بيليروبين bilirubin طبيعي.
- اللون الأبيض الحواري يدل على حدوث يرقان انسدادي obstructive jaundice أي عدم وصول الصفراء إلى البراز.
- اللون الأسود يعود إما إلى وجود دم مهضوم، بسبب نزف هضمي علوي، أو نتيجة تناول مركبات دوائية تحتوي على الحديد iron أو البزموت bismuth. كما أنه يمكن أن يعود إلى تناول بعض الخضار كالسبانخ والملوخية....إلخ.

- **سطح البراز stool surface:**

يجب أن يفحص كامل السطح للتفتيش عن الطفيليات الكهلة بالعين المجردة، وغالباً ما نجد دودة الأقصورة (الحرقص) *Enterobius* أو الصفر الخراطيني *A. lumbricoides* على سطح البراز، وكذلك حلقات الشريطية proglottids *Taenia* وذلك إما على السطح أو بداخل الكتلة البرازية، لذلك يجب أن يحرك البراز بوساطة عود خشبي.

- **الدم blood:**

إذا كان لون الدم أحمر ولماعاً على سطح البراز فيدل ذلك على نزف من البواسير أو من تشقق شرجي أو من ورم مستقيمي أو من تقرح قولوني. أما وجود المخاط المدمى في البراز السائل أو الطري فقد يوحي بوجود الزحار. أما بالنسبة لوجود الدم الخفي في البراز فلا أهمية له عند التفتيش عن الطفيليات وهو يدل غالباً على نزف في الجهاز الهضمي.

- **المخاط mucous:**

يدل على تخرش في القولون، ويظهر بشكل قطعة هلامية شفافة أو غير شفافة فاتحة جداً. ويجب أن يُفحص المخاط جيداً؛ لأنه من الممكن أن يحتوي بخاصة على أتاريف الحيوانات الأوالي.

- **القيح pus:**

يتميز مجهرياً بوجود كريات بيض leukocytes ذات سيتوبلاسما حبيبية ويجب تفريقها جيداً عن المتحولات الحالة للنسج *Entamoeba histolytica*.

- **أشياء عيانية أخرى:**

يمكن أن نرى عيانياً قطعاً متوسفة من الغشاء المخاطي للأنبوب الهضمي وكذلك بعض الألياف النباتية والتي يمكن أن يظنها الشخص العادي أنها نوع من الديدان. كما يمكن أن نشاهد بعض البذور والقطع غير المهضومة كقشور البندورة.

رابعاً: الدراسة المجهرية للعناصر غير الطفيلية

تفيد هذه الدراسة في التعرف على العناصر غير الطفيلية التي تظهر في العينة البرازية. ومن الضروري التعرف عليها؛ لأن لبعضها دلالات مرضية كوجود قطرات الدسم fat drops والنشاء starch، أو لتجنب الخلط بينها وبين الطفيليات المرضية. فمثلاً هناك شبه بين الخلايا الظهارية epithelial cells أو الخلايا البلعمية macrophages والأشكال الناشطة المتحولية (من حيث الشكل والحجم) يؤدي إلى الخلط بينها، لذلك عند إجراء الفحص تلاحظ حركية الأشكال الناشطة ووجود كريات الدم الحمراء في سيتوبلاسماها.

كما يمكن الخلط أحياناً بين كريات الدم البيض والخلايا النباتية وقطرات الدسم والألياف العضلية وحبات غبار الطلع وخلايا الخميرة والفقاعات الهوائية وبين أكياس وبيوض الطفيليات؛ لذلك لا بد من إجراء الفحص المجهري الدقيق.

تشتمل العينة البرازية على مكونات ذات منشأ حيواني ونباتي، إضافة لوجود البلورات، وفيما يأتي أهمها:

1-عناصر حيوانية المنشأ

- **الكريات البيض leukocytes:**

تكون بيضوية الشكل أو كروية، وترى بالمجهر ومحيطها غير منتظم ومجردة من غشائها السيتوبلاسمي (الشكل 2: A). أما سيتوبلاسماها فهي حبيبية ونواتها غير واضحة إلا بعد تلوينها بملونات خاصة كملون رايت (Wright stain).

- **الكريات الحمراء erythrocytes:**

يدل وجود كريات الدم الحمراء على وجود نزف في الجهاز الهضمي، وتظهر بشكل مشوه في العينة البرازية (إما تحاط بجدار غير منتظم مشوك "نزف هضمي علوي" أو تكون كبيرة الحجم وجدارها أملس "نزف هضمي سفلي – بواسير")، (الشكل 2: A).

- **قطرات الدسم fat drops:**

تظهر في العينة البرازية (بسبب إما تناول ملينات زيتية أو وجود ضعف في المعثكلة أو المرارة يؤدي إلى عدم هضم الدسم أو بسبب وجود الإسهال) وتشبه الأشكال المتكيسة للطفيليات، إلاّ أنها تكون مستديرة (الشكل 2: B) وخالية من المكتنفات ومحاطة بطبقة ملساء وهي لماعة بألوان مختلفة (أخضر فاتح أو أخضر مائل للاصفرار).

- **الألياف اللحمية meat fibers:**

يمكن الخلط بينها وبين أكياس الطفيليات المعوية، فهي تظهر في العينة البرازية (الشكل 2: E–D) إما غير مهضومة undigested (كبيرة الحجم ومسطحة مستطيلة أو معينية الشكل غالباً، لها زوايا حادة ولونها ضارب للصفرة وفيها خطوط طولية وعرضية واضحة) أو مهضومة digested (صغيرة الحجم نسبياً وتحوي خطوط عشوائية وليس لها زوايا حادة، لونها أصفر فاتح).

- **خلايا الخميرة yeast cells:**

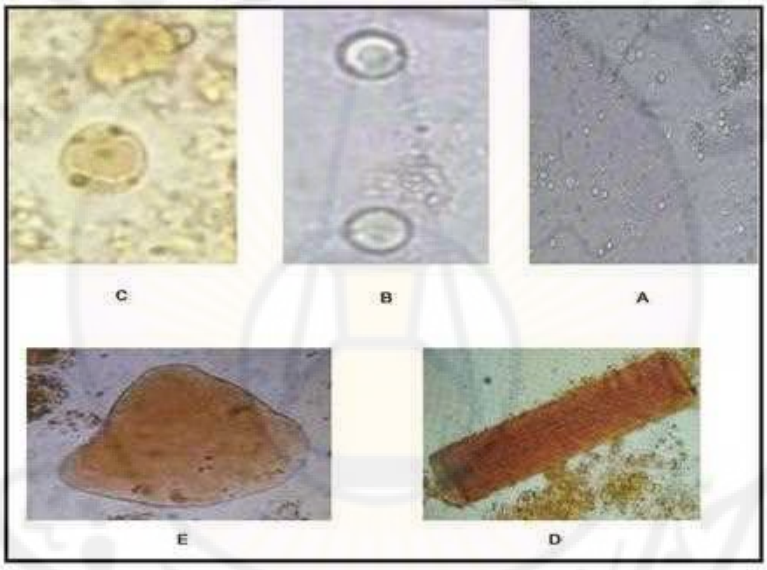
تظهر الخمائر (الشكل 2: C) في العينة البرازية وهي تشبه أكياس بعض أنواع وحيدات الخلية (كالمتحولة القزمة *Endolimax nana*) لأنها تأخذ اللون نفسه، وتحوي فجوة واحدة كبيرة الحجم ومكتنفات. كما يتم الخلط بين هذه الخلايا وبين البيوض الكيسية Oocysts للبوغيات الخفية *Cryptosporidium sp.* في العينة البرازية الرطبة في حين يتم التمييز بينها وبين البيوض الكيسية في العينة البرازية الملونة بـ acid fast حيث تتلون البيوض الكيسية باللون الزهري (أو الأحمر) والخمائر باللون الأخضر.

- **الخلايا البطانية endothelial cells:**

تبدو بدون تلوين كخلية كبيرة غير منتظمة، وذات نواة مركزية واضحة وذات محتوى حبيبي خشن.

- **القيح pus:**

يمكن أن يُرى عيانياً بشكل كتل أو خيوط رمادية عاتمة وليست شفافة كالمخاط، وتبدو بالمجهر على شكل كتلة من الكريات البيضاء المتنكسة قليلا أو كثيراً، ويدل هذا على إنتان الجهاز الهضمي.



الشكل 2: يُظهر أشكال بعض العناصر حيوانية المنشأ: A- كريات حمر وبيض، B- قطرات دسم، C- خلية خميرة، D- ليف لحمي غير مهضوم، E- ليف لحمي مهضوم

2- عناصر نباتية المنشأ

يمكننا مشاهدة عناصر نباتية المنشأ مختلفة من أهمها:

- **السيللوز cellulose:**

يشاهد في العينة البرازية (الشكل 3: A)، وهو عبارة عن خلية نباتية كبيرة الحجم ذات شكل غير منتظم ومحاطة بجدار سميك إما ان تحوي على حبات نشاء (متفرقة أو

مجتمعة) أو أن تكون خالية من النشاء وعندها تأخذ شكل النابض. يشبه هذا الشريط الحلزوني أحياناً حلقات الديدان.

- **الخلايا النباتية plant cells:**

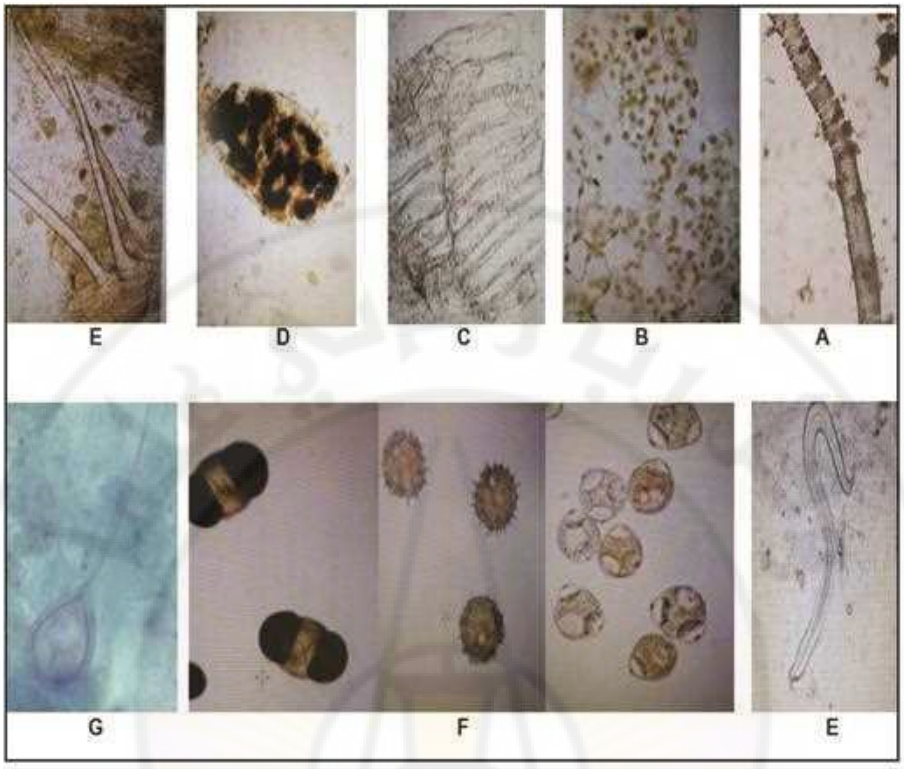
تشبه الخلايا النباتية (الشكل 3: B) التي تظهر في العينة البرازية بعض بيوض الديدان الطفيلية (بيوض المتورقة الرئوية *Paragonimus westermani* أو كيس بيوض ثنائية الفوهات الكلبية *Dipylidium caninum*)، و يمكن تمييزها غالباً من خلال جدارها المضاعف الثخين وتحوي على قناة مركزية إما أن تكون فارغة أو أنها تحتوي على النشاء الذي يتلون باللون البنفسجي بمحلول لوغول. قد يظهر في بعض الأحيان نسج نباتية تحوي عدد من الخلايا النباتية ذات الحدود المنتظمة (الشكل 3: C).

- **النشاء starch:**

يمكن أن تظهر في العينة البرازية حبيبات نشاء (الشكل 3: D) بيضوية أو على شكل دوائر متحدة المركز (تشبه إلى حد كبير الأشكال المتكيسة لوحيدات الخلية) أو مجموعات محاطة بجدار سيللوزي سميك عليه تسننات خشنة غير منتظمة (الخلط بينها وبين بيوض حيات البطن). ويدل وجود النشاء على سوء الهضم.

- **الأوبار أو الأشعار النباتية plant fibers or hairs:**

تظهر في العينة البرازية ويتم الخلط بينها وبين بعض أنواع يرقات الديدان (بسبب التشابه أحياناً بالحجم والشكل)، فمثلاً هناك تشابه بين وبرة الدراق ويرقة الإسطوانية البرازية *Strongyloides stercoralis*. يجب الانتباه أثناء الفحص المجهري إلى أنّ الوبرة (الشكل 3: E) تكون محاطة بجدار مضاعف ثخين ولماع وفيها قناة مركزية فارغة من المحتويات في حين تحوي اليرقة على فم وانتفاخين (البلعوم والمري) وذات لون باهت، وفيها محتوى خلوي.



الشكل 3: يُظهر أشكال بعض العناصر نباتية المنشأ: A- سيللوز، B- خلايا نباتية، C- نسيج نباتي، D- نشاء، E- أوبار نباتية، F- غبار طلع ،G- أبواغ

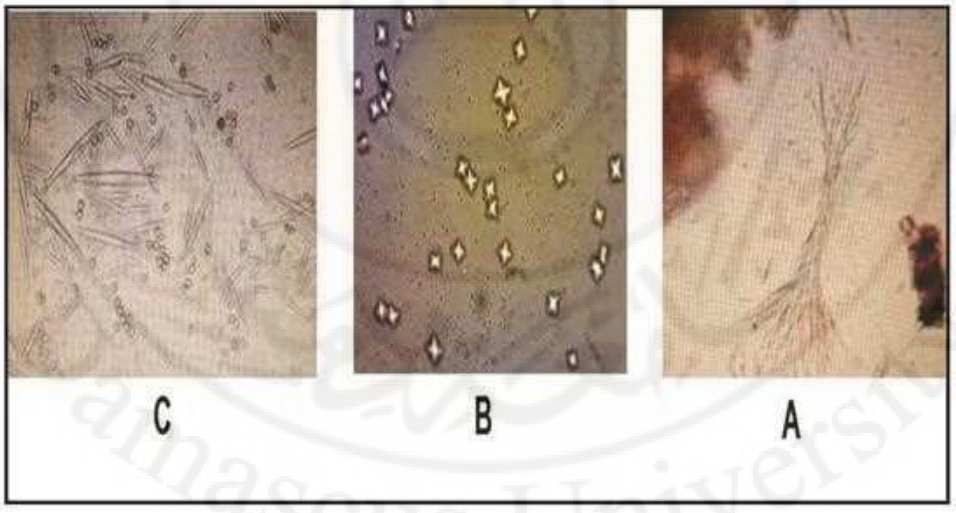
- **غبار الطلع pollens:**

تظهر أحياناً في العينة البرازية ويتم الخلط بينها وبين بيوض الديدان الطفيلية. ولمنع حدوث خطأ في التشخيص لا بد من ملاحظة الشكل الخارجي وظهور أو غياب أي عضيات داخلية، فمثلاً تشبه حبة غبار الطلع pollen grain أحياناً بيضة الشريطيات *Taenia* egg أو بيضة المحرشفة القزمة *H. nana* egg (لتجنب حدوث الخلط يجب ملاحظة غلاف حبة غبار الطلع الرقيق وخلوها من الكلاليب والخيوط القطبية) كما يمكن الخلط بينها وبين بيضة حيات البطن (لتجنب ذلك يجب ملاحظة صغر حجم حبة غبار الطلع وغلافها المزود بتسننات حادة منتظمة وليس حليمات وخلوها من الجنين)، (الشكل F :3).

- **الأبواغ spores:**

قد تظهر الأبواغ في العينة البرازية الملونة بملون trichrome، ويحدث الخلط بينها وبين الأشكال الناشطة أو المتكيسة للجيارديا، ولكن يجب الانتباه إلى عدم وجود: النواتين في القسم الأمامي والقلم المحوري والجسم القاعدي ووجود امتداد طويل يشبه الذيل غير مماثل للسياط عند الجيارديا (الشكل 3: G).

أخيراً لا بد من الإشارة إلى ظهور بعض البلورات (الشكل 4) في العينة البرازية المفحوصة كبلورات الحموض الدسمة fatty acids crystals (إبرية الشكل) أو بلورات حماضات الكالسيوم Calcium oxalate crystals (تشبه المغلف) أو بلورات شاركولايدن Charcot-Leyden crystals (معينية الشكل، تظهر بوضوح في العينة الملونة بـ trichrome ، وهي ناتجة عن تخرب الحمضات eosinophils لدى الأشخاص الذين يعانون من إصابة معوية طفيلية كالزحار الأميبي amoebiasis).



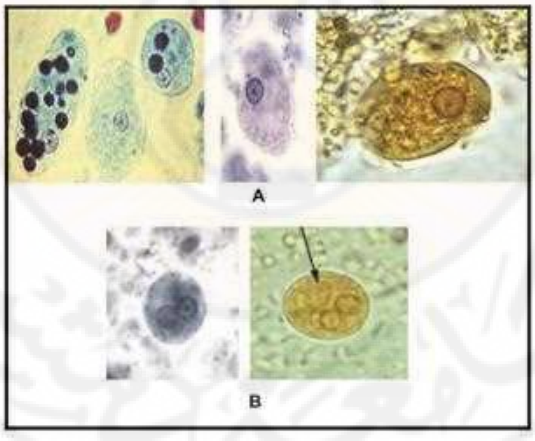
الشكل 4: أشكال البلورات: A- الحموض الدسمة، B- حماضات الكالسيوم، C- شاركولايدن

أولاً: جذريات الأرجل Rizopoda

1- المتحولة الحالة للنسيج (المتحولة الزحارية)

Entamoeba histolytica

الأشكال الناشطة (الأتاريف)trophozoites: تكون متطاولة الشكل في البراز المائي، وسريعة الحركة (وجود أرجل كاذبة رفيعة pseudopodes) ومحاطة بجدار خلوي رقيق (الشكل 5: A). يتراوح حجمها وسطياً بين 10 و 60 µ (غالباً بين 15 و 20 µ) وتحوي على نواة واحدة بداخلها نوية صغيرة مركزية التوضع وكروماتين متجانس التوزع على السطح الداخلي للغشاء النووي وتكون سيتوبلاسماها حبيبية واضحة فيها فجوات تحوي بداخلها أحياناً كريات دم حمراء (يفيد وجود الكريات الحمراء في تشخيص الإصابة بهذا النوع من المتحولات وتمييزه عن باقي الأنواع غير الممرضة).

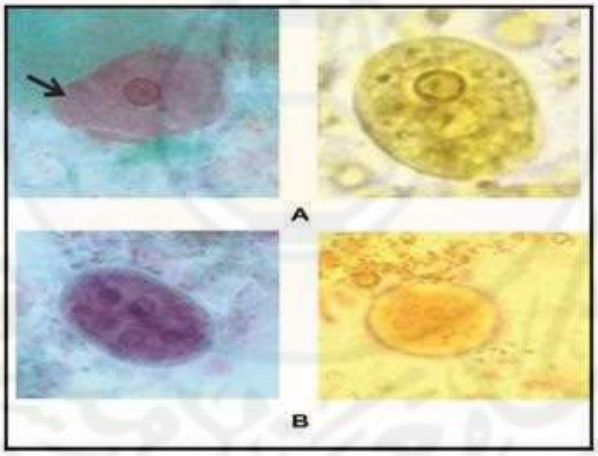


الشكل 5: الشكل الناشط والمتكيس للمتحولة الزحارية في عينتين من البراز: عينة رطبة ملونة بمحلول لوغول وعينة مثبتة ملونة بـ trichrome. A- الشكل الناشط: لاحظ النواة (بداخلها النوية المركزية والكروماتين المتجانس) والسيتوبلاسما تحوي فجوات بداخلها كريات دم حمراء (أجسام عاتمة). B- الشكل المتكيس: لاحظ الأجسام الكروماتيدية ذات النهاية المنتفخة (السهم) والمستديرة والنوى المتعددة.

الأشكال المتكيسة cysts : تكون ساكنة وكروية الشكل غالباً (يتراوح قطر الكيس بين 10 و 15 µ) ومحاطة بغلاف مقاوم. تحوي السيتوبلاسما الحبيبية للكيس على أجسام كروماتيدية واضحة وعلى عدد من النوى (من 1 إلى 4 نوى حسب مرحلة النضج) يوجد بداخلها نوية مركزية التوضع وكروماتين متجانس التوزع على السطح الداخلي للغشاء النووي (الشكل 5: B).

2- المتحولة القولونية *Entamoeba coli*:

الأشكال الناشطة (الأتاريف) trophozoites: تكون محاطة بجدار خلوي رقيق ومتحركة بحركة عشوائية وبطيئة (أرجل كاذبة قصيرة ومفلطحة)، يتراوح حجمها بين 18 و 50 µ. تحوي هذه الأشكال على نواة واحدة بداخلها نوية كبيرة الحجم جانبية التوضع وكروماتين محيطي على شكل كتل غير متجانسة التوزع على السطح الداخلي للغشاء النووي وتكون السيتوبلاسما الحبيبية واضحة ومليئة بالفجوات (الشكل 6: A).



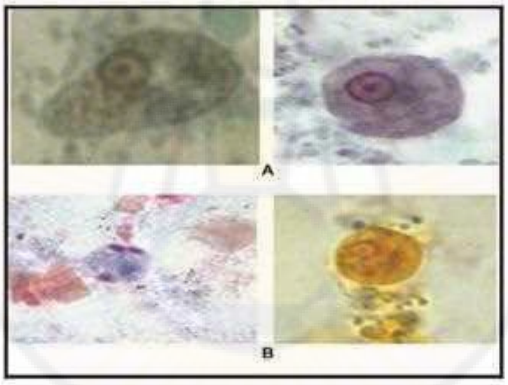
الشكل 6: الأشكال الناشطة والمتكيسة للمتحولة القولونية في عينتين من البراز: رطبة ملونة بمحلول لوغول- مثبتة وملونة بـ trichrome. A- الشكل الناشط: لاحظ الرجل الكاذبة (سهم)، النواة ومحتواها، السيتوبلاسما ومحتواها من الفجوات. B- الشكل المتكيس: لاحظ النوى وظهور الغليكوجين على شكل كتل.

الأشكال المتكيسة cysts: تكون ساكنة وكروية الشكل (متطاولة أحياناً)، يتراوح قطر الكيس بين 10 و 35 µ (غالباً بين 10 و 20 µ) ويكون محاطاً بغلاف مقاوم (الشكل

6: B). تحوي سيتوبلاسما الكيس من 1 إلى 8 نوى صغيرة (داخل كل واحدة نوية جانبية التوضع والكروماتين المحيطي حبيبي خشن غير متجانس التوزع على السطح الداخلي للغشاء النووي)، وكتل منتشرة من الغليكوجين. تكون الأجسام الكروماتيدية (في حال ظهورها) رفيعة ذات نهايات حادة (تشبه الشظايا).

3- المتحولة الهارتمانية *Entamoeba hartmanni*

الأشكال الناشطة trophozoites: تكون متحركة (أرجل كاذبة إصبعية)، يتراوح حجمها بين 5 و 15 µ وتحوي على نواة بداخلها نوية مركزية التوضع وعلى كروماتين محيطي متجانس التوزع على السطح الداخلي للغشاء النووي (النواة غير واضحة في العينات غير الملونة). تكون سيتوبلاسما هذه الأشكال حبيبية ناعمة تحوي فجوات غذائية بداخلها بكتيريا (الشكل 7: A).

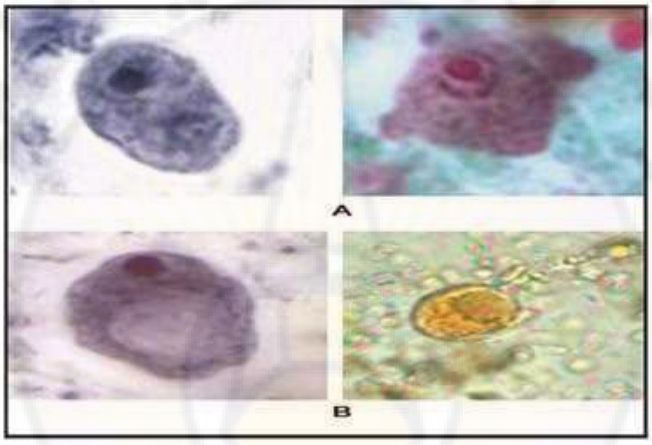


الشكل 7: الشكل الناشط والمتكيس للمتحولة الهارتمانية في عينات برازية: رطبة وملونة بمحلول لوغول، مثبتة وملونة بـ trichrome. A- الشكل الناشط، B- الشكل المتكيس. لاحظ النواة وفيها النوية مركزية التوضع، الأجسام الكروماتيدية ذات نهاية مستديرة

الأشكال المتكيسة cysts: تكون كروية أو بيضوية الشكل، تشبه أكياس المتحولة الزحارية ولكنها أصغر حجماً (يتراوح حجم الكيس تقريباً بين 5 و 10 µ)، تحوي الأكياس الناضجة (الشكل 7: B)، في سيتوبلاسماها على 4 نوى تشبه نواة الشكل الناشط، وأحياناً على كتل مبعثرة من الغليكوجين وأجسام كروماتيدية متطاولة ذات نهاية منتفخة ومستديرة (صعبة المشاهدة في العينة غير الملونة).

4- المتحولة اليودية البوتشيلية *Iodamoeba buetschlii*

الأشكال الناشطة trophozoites: تكون محاطة بجدار خلوي رقيق ومتحركة بحركة عشوائية وبطيئة (أرجل كاذبة إصبعية)، يتراوح حجمها بين 8 و 22 µ. تحوي هذه الأشكال على سيتوبلاسما حبيبية يُشاهد فيها فجوات غذائية (بداخلها جراثيم وخمائر وغيرها) ونواة واحدة بداخلها نوية كبيرة الحجم ومركزية محاطة بحبيبات صغيرة غير كروماتينية (الشكل 8: A).

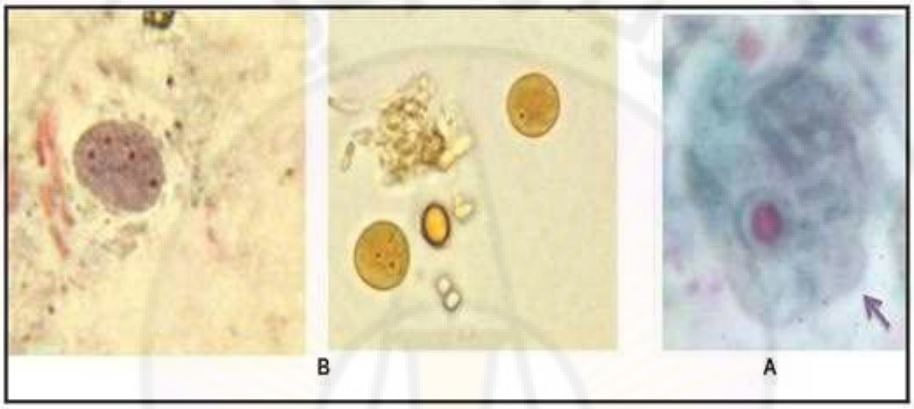


الشكل 8: الشكل الناشط والمتكيس للمتحولة البوتشيلية في عينات برازية: رطبة وملونة بمحلول لوغول، مثبتة وملونة بـ trichrome. A- الشكل الناشط: لاحظ النواة وبداخلها نوية كبيرة الحجم مركزية التوضع. B- الشكل المتكيس: لاحظ فجوة كبيرة من الغليكوجين ملونة باللون البني (لوغول) وعديمة اللون (بـ trichrome).

الأشكال المتكيسة cysts: تكون كروية أو بيضوية أو إهليليجية الشكل، يتراوح حجم الكيس بين 8 و 15 µ (قد يصل أحياناً إلى 20 µ)، تحوي الأكياس (الشكل 8: B) في سيتوبلاسماها على نواة واحدة بداخلها نوية كبيرة الحجم وحبيبات حول النوية واضحة في العينات البرازية المثبتة والملونة بـ trichrome، وعلى كتلة كبيرة محددة الشكل من الغليكوجين (تظهر ملونة بالبني في عينة برازية ملونة بمحلول لوغول، وعديمة اللون على شكل كتلة واضحة في عينة مثبتة وملونة بملون trichrome).

5- المتحولة القزمة *Endolimax nana*

الأشكال الناشطة trophozoites: بطيئة الحركة (أرجل كاذبة عريضة وقصيرة)، صغيرة الحجم (يتراوح حجمها بين 5 و 12 µ)، تحوي سيتوبلاسماها الحبيبية فجوات غذائية ونواة بداخلها نوية كبيرة غير منتظمة الشكل (هلالية أو مستديرة) لا مركزية التوضع (الشكل 9: A).



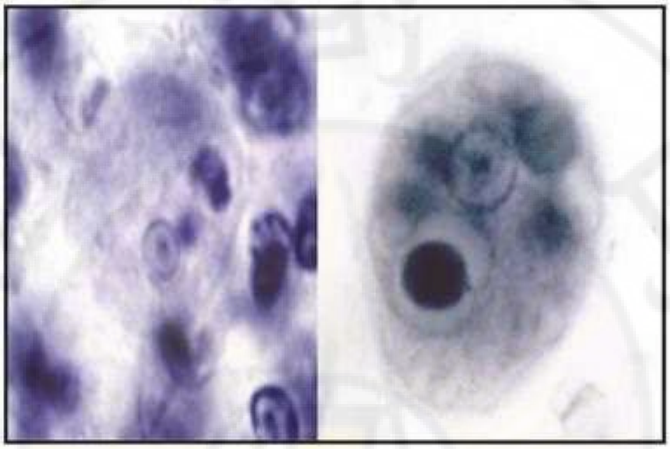
الشكل 9: الشكل الناشط والمتكيس للمتحولة القزمة في عينات برازية: رطبة وملونة بمحلول لوغول، مثبتة وملونة بـ trichrome. A- الشكل الناشط: لاحظ الرجل الكاذبة (السهم) النواة وفيها النوية كبيرة الحجم.
B- الشكل المتكيس: لاحظ النوى وبداخلها نوية كبيرة الحجم.

الأشكال المتكيسة cysts: تكون كروية أو إهليليجية الشكل، يتراوح حجمها بين 5 و 10 µ. تحوي سيتوبلاسما الأكياس الناضجة على أربع نوى لها صفات نواة الشكل الناشط (صعبة المشاهدة في عينة غير ملونة) وعلى حبيبات مبعثرة من الغليكوجين وفجوات (الشكل 9: B).

6- المتحولة اللثوية *Entamoeba gingivalis*

يكون الشكل الناشط سريع الحركة (أرجل كاذبة متعددة)، يتراوح حجمه بين 8 و 20 µ. تحوي سيتوبلاسما هذا الشكل فجوات (بداخلها غالباً كريات دم بيض وأحياناً جراثيم أو بقايا غذائية أو كريات دم حمر) ونواة كبيرة الحجم بداخلها نوية صغيرة مركزية التوضع

(الشكل 10). لا تتكيس على الإطلاق وتعيش في الجيوب اللثوية عند قاعدة الأسنان (تؤخذ العينة من المادة المتراكمة على اللثة باستخدام عود خشبي دقيق ونظيف). ولابد من التنويه إلى ضرورة التمييز بين المتحولة الزحارية والمتحولة اللثوية في حال ظهورها، عند فحص عينة قشع لمصاب بخراج رئوي.



الشكل 10: الشكل الناشط للمتحولة اللثوية بعد التلوين بـ trichrome.

ثانياً: السوطيات Flagellata

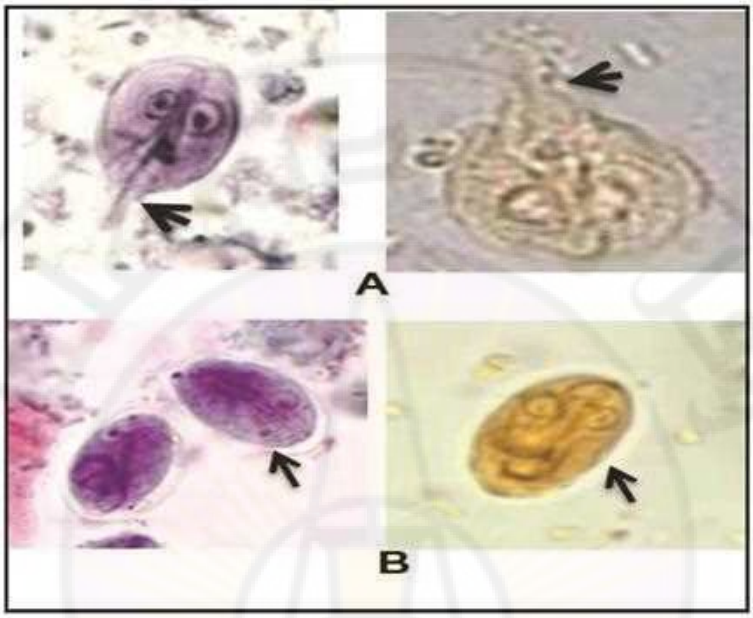
1- الجيارديا المعوية *Giardia intestinalis*

(syn. *G. lamblia, G. duodenalis*)

الأشكال الناشطة trophozoits: إجاصية الشكل ومتناظرة جانبياً (يتراوح طولها بين 12 و 15 µ وعرضها بين 6 و 10 µ). يتميز هذا الشكل بنهاية أمامية عريضة (الشكل 11: A) يتوضع فيها نواتان كبيرتان وقرصان للتثبت suction disc (تُستعمل للتثبت على مخاطية الظهارة المعوية) إضافة إلى وجود الجسم القاعدي والسياط (عددها 8).

الأشكال المتكيسة cysts: بيضوية أو إهليليجية الشكل، صغيرة الحجم (يتراوح طولها بين 9 و 14 µ وعرضها بين 6 و 9 µ). تكون محاطة بغلاف مقاوم سميك (الشكل 11: B) وتحوي بداخلها 4 نوى (الكيس الناضج) متوضعة غالباً في أحد قطبي الكيس إلى جانب

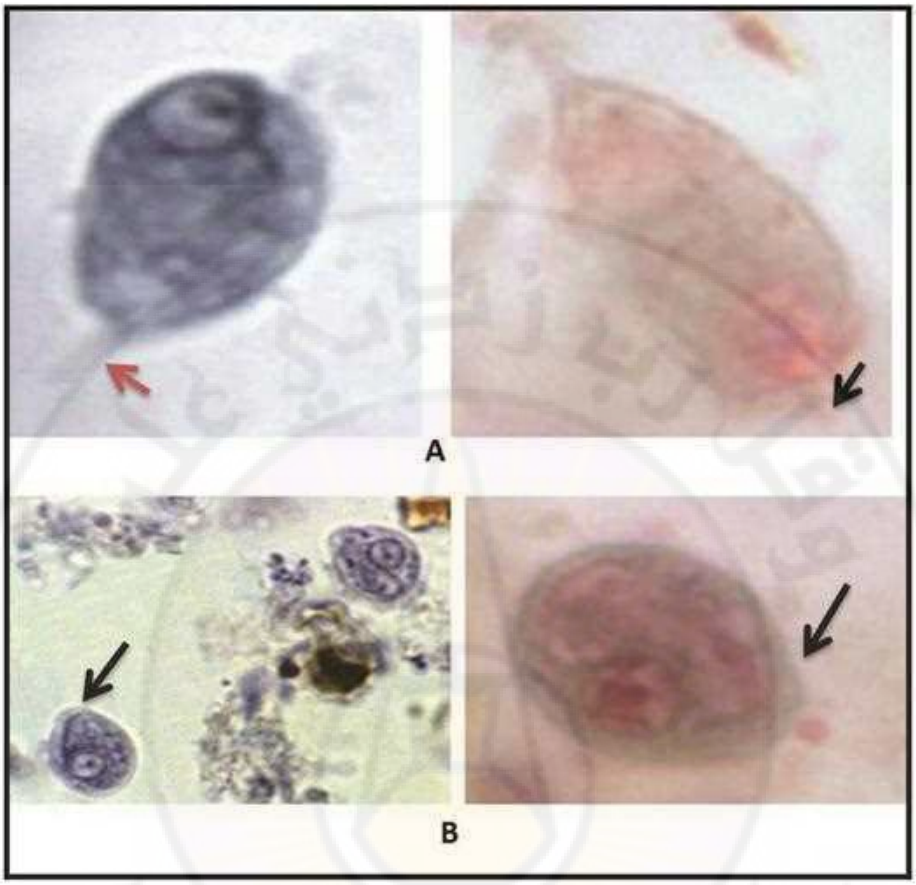
بقايا الجهاز المحرك أو السياط (شكل حرف S). تظهر هذه الأشكال واضحة في العينة البرازية (سواء كانت غير ملونة أو ملونة بمحلول لوغول أو trichrome).



الشكل 11: الشكل الناشط والمتكيس للجيارديا المعوية في عينتين من البراز: عينة رطبة وملونة بمحلول لوغول وعينة مثبتة وملونة بـ trichrome. A- الشكل الناشط: لاحظ وجود النواتين، الجهاز المحرك (السهم). B- الشكل المتكيس: لاحظ النوى في أحد قطبي الكيس، بقايا السياط، انكماش السيتوبلاسما بعيداً عن جدار الكيس (السهم).

2- شفوية السياط *Chilomastix mesnili*

الأشكال الناشطة trophozoits: يأخذ الشكل الناشط شكلاً إجاصياً (6-24 × 3 -10 ميكرون) ويكون مزوداً بأربعة سياط، ثلاثة منها تمتد من الثغر الفموي باتجاه النهاية الأمامية، أما السوط الرابع فيوجد في قاعدته. كما يحوي هذا الشكل نواة واحدة بداخلها نوية صغيرة الحجم مركزية التوضع (الشكل 12: A).



الشكل 12: الشكل الناشط والمتكيس لشفوية السياط. A- الشكل الناشط: لاحظ وجود النواة والجهاز المحرك من النهاية الأمامية (السهم الأسود)، القلم المحوري (السهم الأحمر). B- الشكل المتكيس: لاحظ البروز القمي (السهم)، النواة وبداخلها نوية مركزية التوضع، بقايا السياط.

الأشكال المتكيسة cysts: كروية الشكل ذات بروز قمي (يعطيه شكل الليمونة)، يتراوح حجمها بين 6 و 10 µ. يكون الكيس محاطاً بغلاف سميك ومقاوم (الشكل 12: B)، يحوي بداخله نواة تحوي على نوية مركزية، وعلى بقايا الجهاز المحرك (ألياف منحنية).

التطبيق العملي

- تحضير عينة برازية وتلوينها بملون لوغول
- التفتيش عن المكونات الطبيعية (حيوانية، نباتية، بلورات) في العينة البرازية مع الرسم.
- التفتيش عن وحيدات الخلية المعوية ودراسة أشكالها الناشطة، وأشكالها المتكيسة وملاحظة الميزات العامة لكل منها مع الرسم.

ثالثاً: الديدان المنبسطة Platyhelminthes

1- صف المثقوبات Trematoda

يمكن تمييز البنى الداخلية للديدان المثقوبة البالغة (كالمتورقة *Fasciola* والمنشقات *Schistosoma*) بسهولة في العينات الملونة بصباغ كارمن أو بمحلول الهيماتوكسيلين. حيث يتم تحضير الديدان البالغة (قبل التلوين) وفقاً للخطوات الآتية:

- وضع الدودة على صفيحة زجاجية.
- صب سائل فيزيولوجي فوقها بسرعة ومن ثم حمض خل كثيف.
- تغطية الدودة بساترة أو صفيحة زجاجية مع الضغط عليها بلطف.
- نزع الدودة من الصفيحة وتركها لتسقط في طبق بتري ثمّ وضع المثبت (كالفورمالين) فوقها وتركها لمدة عدة ساعات.
- غسل الدودة بماء الصنبور لإزالة آثار المثبت.
- نزع الماء عن طريق وضعها في حمامين من الكحول 30% و 50% لمدة تتراوح بين 15 و 60 دقيقة (حسب حجم العينة).
- وضع العينة في الكحول اليودي 70% من ساعة لعدة ساعات.

<u>التلوين بصباغ كارمن Carmen dye</u>:

- غمر الدودة بمحلول كارمن المنحل بالكحول الإيتيلي 70% لمدة ساعة (أو عدة ساعات حسب حجم العينة).

- غسل العينة مرتين بالكحول 70% (5 ثواني لكل مرة).
- غمر الدودة بالكحول الحامضي (كحول 70% وحمض كلور الماء 0.5-1%) مدة 5 ثواني.
- غسل العينة بالكحول 70% ثلاث مرات متتالية (5 ثواني لكل مرة).
- نزع الماء من العينة بوضعها في حمامات كحول متزايدة التركيز 80%، 90%، 100% (ساعة لكل تركيز).
- وضع الدودة في الكزيلول لمدة ساعة ومن ثم نقلها إلى صفيحة عليها بلسم كندا وتغطيتها بساترة وتجفيفها على سخان شرائح بالدرجة 60 مئوية.

التلوين بصباغ الهيماتوكسيلين Haematoxylin dye:

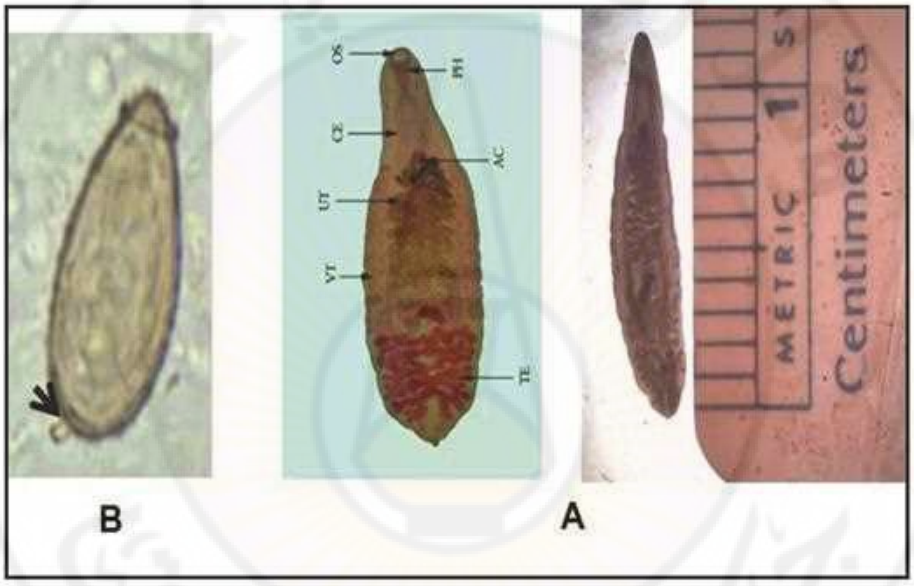
- بعد إخراج العينة من الكحول اليودي، توضع في حمامين من الكحول 50% ثم 30% لمدة تتراوح بين 15 و 60 دقيقة (لكل حمام).
- غسل الدودة بماء الصنبور لمدة 5 ثواني.
- غمر الدودة بمحلول الهيماتوكسيلين (حجم ملون + 9 حجوم ماء مقطر) لمدة ساعة (أو عدة ساعات حسب حجم العينة).
- بعد غسل العينة مرتين متتاليتين بالماء (5 ثواني لكل مرة) توضع في الكحول الحامضي 70% لمدة 5 ثواني.
- غسل العينة بالكحول 70% ثلاث مرات متتالية (5 ثواني لكل مرة).
- بعد نزع الماء من الدودة، بوضعها في حمامات كحول متزايدة التركيز 80%، 90%، 100% (ساعة لكل تركيز)، توضع في الكزيلول لمدة ساعة ومن ثم تنقل إلى صفيحة عليها بلسم كندا وتغطى بساترة وتجفف على سخان شرائح بالدرجة 60 مئوية.

آ- متفرعة الخصية الصينية *Clonorchis sinensis*

الدودة البالغة: منبسطة (10-20 ملم × 3-5 ملم) مزودة بمحجمين (أمامي فموي كبير وخلفي بطني صغير)، خنثى يكون المبيض فيها متوضعاً أمام الخصى المتشعبة (الشكل

13: A). تعيش عند المضيف النهائي (الإنسان) في الكبد والحويصل الصفراوي والقنوات الصفراوية.

البيوض: بيضوية الشكل، صغيرة الحجم (يتراوح حجمها من 27–35 µ × 11–20 µ)، جنينية (فيها جنين مهدب) في لحظة الطرح في العينة البرازية، مزودة بغطاء في إحدى النهايتين . يظهر في الجهة المقابلة للغطاء نتوء صغير على شكل الشوكة (الشكل 13: B).

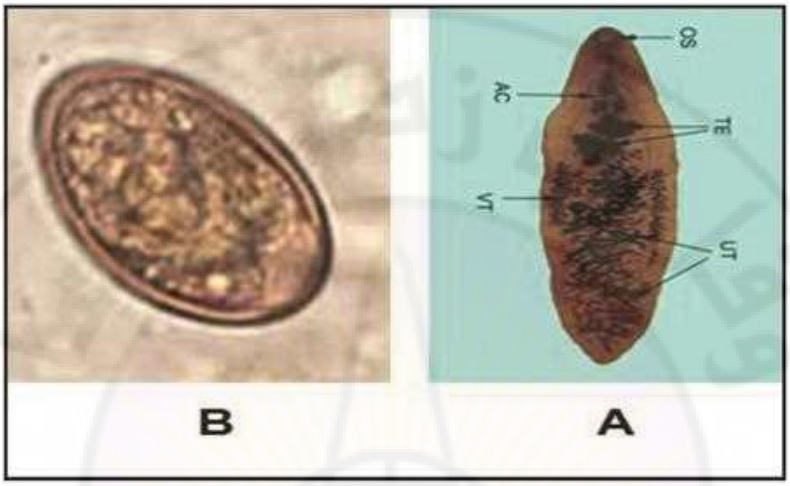


الشكل 13: A– الدودة البالغة ملونة بملون كارمن. لاحظ: المحجم الأمامي (OS)، المحجم البطني (AC)، البلعوم (PH)، الأعور (CE)، الرحم (UT)، الخصى (TE)، الغدد المحية (VT). B– بيضة متفرعة الخصية في عينة برازية. لاحظ: النتوء الصغير (السهم)، الغطاء، الجنين المهدب

ب– متفرعة المعي السنانية *Dicrocoelium dendriticum*

الدودة البالغة: منبسطة، (5–12 ملم × 1.5–2.5 ملم)، سطحها أملس، نهايتها الأمامية أدق من الخلفية، مزودة بمحجمين (أمامي فموي صغير وخلفي بطني كبير)، خنثى تكون الخصى متوضعة مباشرة خلف المحجم البطني (الشكل 14: A). تعيش في القنوات الصفراوية عند المضيف النهائي (المجترات، أحياناً الإنسان وآكلات اللحوم).

البيوض: بيضوية غير متناظرة يتراوح حجمها 35-45 µ × 20-30 µ، محاطة بغلاف سميك (لونه بني داكن)، غطائية، جنينية (فيها جنين مهدب) في لحظة الطرح في العينة البرازية (الشكل 14: B).

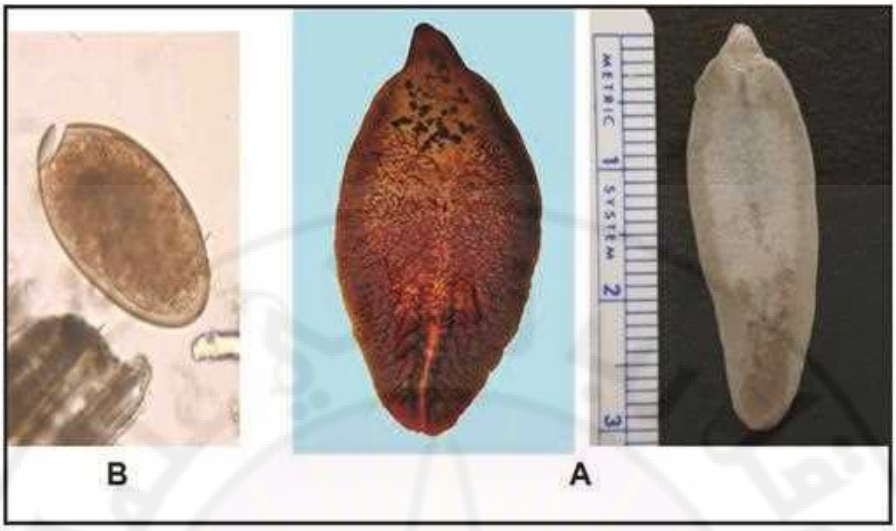


الشكل 14: A- الدودة البالغة ملونة بملون كارمن. لاحظ: المحجم الأمامي (OS)، المحجم البطني (AC)، الرحم (UT)، الخصى (TE)، الغدد المحية (VT). B- بيضة متفرعة المعي في عينة برازية. لاحظ: الغلاف، الغطاء، الجنين المهدب

ج- المتورقة الكبدية *Fasciola hepatica*

الدودة البالغة: منبسطة، كبيرة الحجم (5-25 ملم × 10-15 ملم)، جسمها مزود بشويكات صغيرة، النهاية الأمامية أدق من الخلفية، مزودة بمحجمين (أمامي وخلفي)، خنثى (الشكل 15: A). تعيش في القنوات الصفراوية عند المضيف النهائي (المجترات، الإنسان بشكل عارض).

البيوض: بيضوية الشكل (130-150 µ × 60-9 µ)، غطائية operculated، غير جنينية في لحظة الطرح مع البراز (الشكل 15: B).

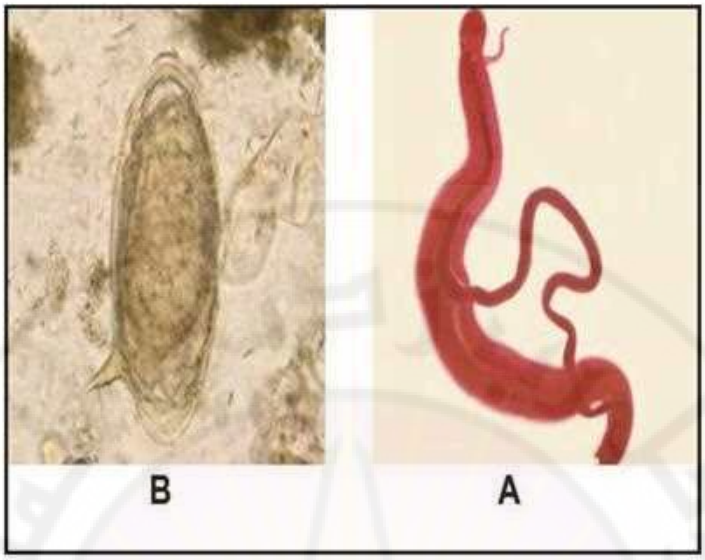


الشكل 15: A- الدودة البالغة للمتورقة الكبدية (مثبتة وغير ملونة – مثبتة وملونة بملون كارمن).
B- بيضة المتورقة في عينة برازية . لاحظ: الحجم الكبير، الغطاء.

د- المنشقة المعوية *Schistosama mansoni*

الدودة البالغة: منفصلة الجنس (الشكل 16: A)، الذكر: مسطح، له حواف ملتفة، يملك ميزابة تناسلية بطنية ويتراوح طوله بين 6 و 12 ملم، الأنثى: اسطوانية، طويلة (7-17 ملم). تعيش الديدان البالغة عند المضيف في الأوعية المساريقية للقولون وفي الأوردة البابية الكبدية.

البيوض: كبيرة الحجم (140-170 µ × 45-70 µ)، تحوي شوكة طويلة جانبية التوضع، جنينية (تحوي جنين مهدب) في لحظة الطرح مع البراز (الشكل 16: B).



الشكل 16: A- الديدان البالغة للمنشقة في لحظة الاحتضان. لاحظ: الأنثى في جيب الاحتضان عند الذكر. B- بيضة المنشقة المعوية في عينة برازية. لاحظ: الشوكة الجانبية، الجنين المهدب

ولتحديد حيوية بيوض المنشقات يطبق اختبار فقس البيوض، حيث يشير ظهور الجنين المهدب إلى إصابة نشيطة تحتاج إلى معالجة. ولإجراء هذه الاختبار، تمزج كمية من العينة البرازية (من 5 إلى 10 غ من براز غروي أو أكثر من 50 غ من براز ليفي) في حجم مماثل من الماء في وعاء كبير مسطح الجوانب. وبعد ذلك، يُملأ هذا الوعاء بعناية بالماء حتى القمة تقريباً وتُغطى ثلاث جهات منه بورق من السيلوفان في حين يسلط على الجهة الرابعة ضوء طبيعي أو منبع ضوء صنعي. وبعد مضي عدة ساعات تفقس البيوض لتخرج منها أجنة مهدبة سابحة باتجاه الضوء. يمكن رؤية هذه الأجنة باستخدام عدسة مكبرة أو بأخذ قطرة من السائل ووضعها على صفيحة زجاجية لفحصها مجهرياً.

التطبيق العملي

- **المتورقات:** يُطلب مشاهدة الأشياء التالية ورسمها: الديدان البالغة adults ومحتواها، بيوض غطائية operculated eggs، جنين مهدب meracidiae، أكياس بذور sporocysts، ريديات rediae، أجنة مذنبة cercariae.

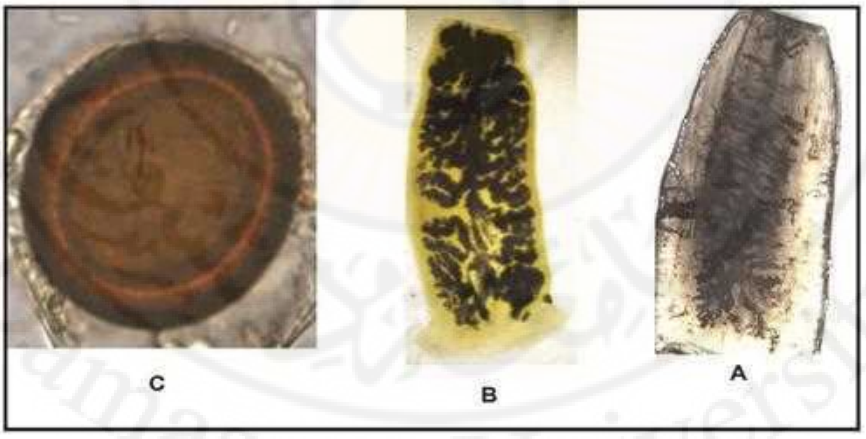
- **المنشقات:** يُطلب مشاهدة كل مما يلي ورسمه: الديدان البالغة adults، حالة الاحتضان، بيوض المنشقات eggs، أجنة مهدبة meracidiae، أكياس بذور sporocysts (أولية – ثانوية)، جنين مذنب cercariae.

2- صف الشريطيات Cestoda

آ- الشريطية العزلاء *Taenia saginata*

الشريطية المسلحة *Taenia solium*

حلقات الشريطية الكهلة الحاملة للبيوض: طولها أكثر من عرضها في كلا النوعين، الرحم فيها متشعب جانبياً من 12 إلى 30 تشعب (الشريطية العزلاء) ومن 7 إلى 13 تشعب (الشريطية المسلحة)، الثقوب التناسلية متناوبة جانبية غير منتظمة التوضع (الشريطية العزلاء) أو جانبية منتظمة التوضع (الشريطية المسلحة). تطرح منفردة (الشريطية العزلاء) أو على شكل سلاسل (الشريطية المسلحة). ويكون تمييز هذه الحلقات المعتمد على تحديد عدد تفرعات الرحم صعباً، لذلك يستعمل الحبر الصيني لتحديد عدد الشعب الرحمية في الحلقة الكهلة بعد حقنه بداخلها (الشكل 17: A و B).



الشكل 17: حلقات الشريطية الكهلة ملونة بالحبر الصيني. لاحظ اختلاف عدد تشعبات الرحم في (A) الشريطية العزلاء، (B) الشريطية المسلحة. C- بيضة الشريطيات في عينتين من البراز: عينة رطبة غير ملونة وعينة مكثفة بالفورمالين وملونة بمحلول لوغول. لاحظ: الغلاف السميك، الخطوط التزيينية الشعاعية، بعض كلابات الجنين

خطوات العمل:

- حقن مادة الحبر الصيني في مركز الحلقة أو عن طريق الثقب التناسلي لتعبئة شعب الرحم بالحبر.
- ضغط الحلقة بين صفيحتين زجاجيتين وفحصها تحت المجهر لرؤية التفرعات الرحمية وتحديد عددها.

ولا بد من أخذ الحيطة والحذر عند التعامل مع هذه الحلقات خاصة وأن بيوض الشريطية المسلحة معدية بالنسبة للإنسان.

البيوض: لا يمكن تمييزها عن بعضها البعض. كروية الشكل (30–45 µ) محاطة بغلاف سميك وفيها خطوط شعاعية تزيينة محيطية، بداخلها جنيناً مسدس الأشواك (الشكل 17: C).

ب– المحرشفة القزمة *Hymenolepis nana*

البيوض: كروية أو بيضوية الشكل، صغيرة الحجم (35 × 45 µ)، محاطة بغلافين خارجي وداخلي (الغلاف الداخلي مزود بقطبين يخرج منهما من 4 إلى 8 ألياف قطبية تنتشر بين الغلافين)، تحوي جنين مسدس الأشواك (الشكل 18).

ج–المحرشفة الصغيرة *Hymenolepis diminuta*

البيوض: كروية أو بيضوية الشكل، كبيرة الحجم نسبياً (60 × 80 µ)، محاطة بغلافين خارجي وداخلي، لا تحوي ألياف قطبية بين الغلافين، بداخلها جنين مسدس الأشواك (الشكل 19).

الشكل 18: بيضة المحرشفة القزمة في عينة برازية. لاحظ: جنين مسدس الأشواك وفيه عدد من الكلاليب، الألياف القطبية في الفراغ بين الغلافين

الشكل 19: بيضة المحرشفة الصغيرة في عينة برازية. لاحظ: الغلافين والجنين مسدس الأشواك

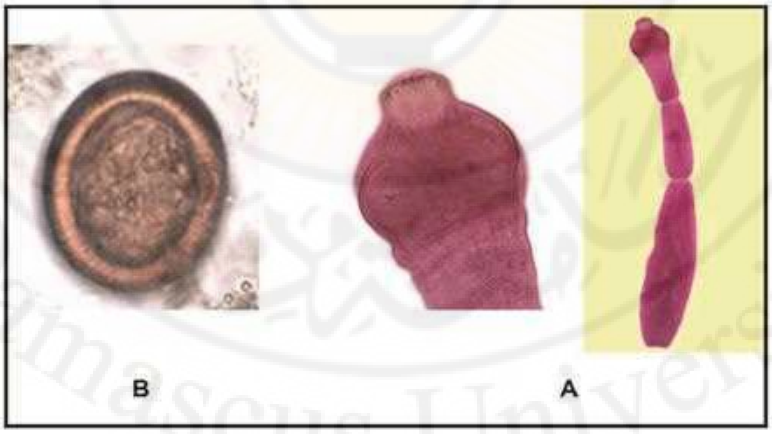
د- العوساء العريضة *Diphyllobothrium latum*:

البيـوض: بيضـوية الشـكل، متنـاظرة، يتـراوح حجمهـا بـين 55-75 µ × 40-50 µ، محاطة بغلاف سميك، مزودة بغطاء، غير جنينية (الشكل 20).

الشكل 20: بيوض العوساء العريضة: الغطاء المفتوح، النتوء في الجهة المقابلة للغطاء (سهم)

هـ- المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus*

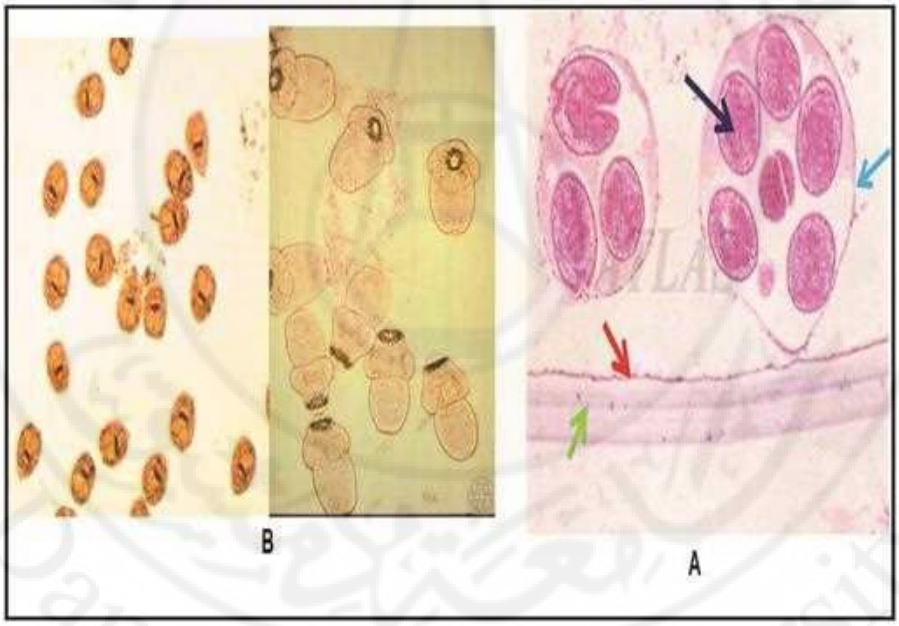
الدودة البالغة: توجد فقط عند المضيف النهائي (الكلب وأنواع أخرى من آكلات اللحوم)، صغيرة الحجم (3-6 ملم)، تتألف من رأس (يحوي 4 محاجم وحيزوم وعدد من الكلاليب "25-50 كلابة") وثلاث حلقات (الحلقة الأخيرة هي الكهلة الحاملة للبيوض، (الشكل 21: A).



الشكل 21: A- الدودة البالغة للمشوكة الحبيبية ملونة بصباغ كارمن. لاحظ: واحد من المحاجم، الحيزوم والكلابات. B- بيضة المشوكة الحبيبية في عينة برازية (مأخوذة من كلب). لاحظ: الغلاف السميك والخطوط الشعاعية، الجنين مسدس الاشواك

بما أنّ الكلب هو المضيف النهائي فإنه من غير المتوقع رؤية البيوض في براز الإنسان؛ لذلك لا يمكن الاعتماد عليها في تشخيص الإصابة عنده. ولا يمكن تمييز بيوض هذه الدودة عن بيوض باقي أنواع الشريطيات، يتراوح حجم البيضة من 30 إلى 35 µ وتكون محاطة بغلاف سميك ومزودة بخطوط شعاعية تزيينية وبداخلها جنين مسدس الأشواك (الشكل 21: B).

الكيسة المائية hydatid cyst: يمكن أن يصاب الإنسان ببيوض هذه الديدان عن طريق تناول الغذاء أو الماء الملوثين ببراز الكلاب (أو أي آكل لحوم). فبعد هضم البيوض، يتحرر الجنين مسدس الأشواك الذي يهاجر من لمعة المعي إلى أماكن أخرى في الجسم (كالكبد، والرئة والدماغ) ليتطور ويعطي الكيسة المائية (الشكل 22: A–B).



الشكل 22: A– مقطع عرضي في كيسة مانية: الطبقة الخارجية الصفيحية (سهم اخضر)، الطبقة الرقيقة الداخلية المنتشة المنواة (سهم أحمر)، الكيسة الثانوية (سهم أزرق)، الرؤوس الأولية (سهم أسود)، B–الرؤوس الأولية المنخمصة والناتئة

التطبيق العملي

يُطلب مشاهدة ما يلي ورسمه: الديدان البالغة (منطقة الرأس head or scolex والمحاجم suckers والحيزوم rostellum والكلابات hooks إن وجدت)، حلقة فتية immature proglottid، حلقة ناضجة mature proglottid، حلقة كهلة gravid proglottid، البيوض eggs، كيسة حويصلي الذنب cysticercus، مقطع في كيسة عدارية hydatid cyst section- رؤوس أولية protoscolex.

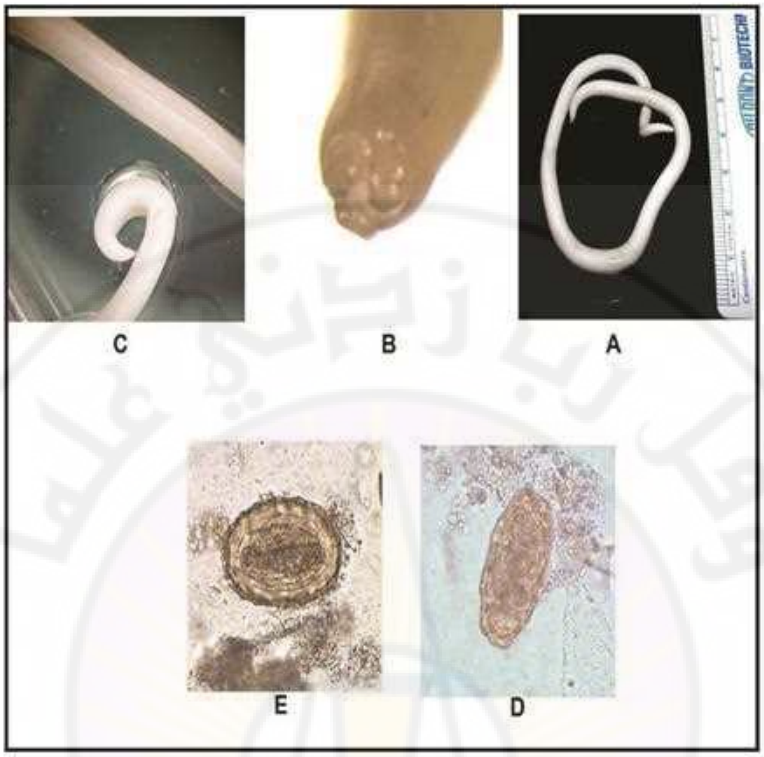
رابعاً: الديدان الممسودة Nematoda

1- حيات البطن *Ascaris lumbricoides*

الدودة البالغة: حبلية، كبيرة الحجم، منفصلة الجنس: الأنثى طويلة (20-35 سم) ذات نهاية خلفية مستقيمة مخروطية، الذكر قصير نسبياً (15-31 سم) ذو نهاية خلفية معقوفة مزودة بشوكتين. تكون النهاية الأمامية مزودة بثلاث شفاه (الشكل 23: A-B-C).

البيوض غير المخصبة: متطاولة، أكبر من البيضة المخصبة (80-90 µ)، محاطة بقشرة رقيقة (يوجد على سطحها الخارجي حليمات تزيينة متباينة الحجم)، بداخلها حبيبات كروية الشكل وكبيرة الحجم (الشكل 23: D).

البيوض المخصبة: تطرح مع البراز، وهي بيضوية أو كروية الشكل، محاطة بقشرة سميكة مضاعفة (يوجد على سطحها الخارجي حليمات تزيينة بنية اللون)، بداخلها خلية واحدة مركزية عديمة اللون أو صفراء شاحبة (الشكل 23: E).



الشكل 23: A- الدودة البالغة لحيات البطن. لاحظ: الشفاه في النهاية الأمامية للجنسين "B"، النهاية الخلفية الملتفة للذكر "C". بيضة غير مخصبة "D"، بيضة مخصبة وفيها يرقة واضحة "E"

2- شعرية الرأس *Trichuris trichiura*

البيوض: ليمونية الشكل، يتراوح حجمها بين 50-55 µ × 20-25 µ، محاطة بقشرة سميكة ومزودة بسدادتين مخاطيتين شفافتين (الشكل 24). تكون غير جنينية عندما تطرح مع البراز.

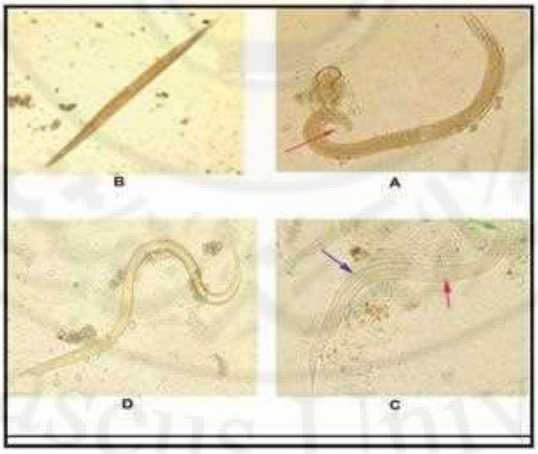
الشكل 24: بيضة شعرية الرأس في عينة برازية. لاحظ: السدادتين المخاطيتين، الكتلة الجنينية

3- الإسطوانية البرازية *Strongyloides stercoralis*:

الدودة البالغة: إما متطفلة على الإنسان (إناث فقط: إسطوانية الشكل طويلة "2-3 ملم" فيها مري بانتفاخ وحيد، تخرج منها يرقات ربدية تتطور إلى يرقات خيطية معدية داخل المصاب "حلقة مباشرة") أو موجودة في التربة (الذكور قصيرة، طولها 750 µ، الإناث طويلة 1 ملم ويكون المري مجهز بانتفاخين، مسؤولة عن "حلقة العدوى غير المباشرة")، (الشكل 25: A، B).

اليرقة الربدية Rhabditiform larva (المرحلة الأولى): يتراوح طولها بين 180 و 380 µ، تملك قناة فموية صغيرة، مري منتفخ قليلاً، جهاز تناسلي مسيطر (الشكل 25: C). تشاهد عادة في العينة البرازية (البيوض تفقس في مخاطية المعي الدقيق عند المضيف) وفي التربة.

اليرقة الخيطية filariform larva المعدية (المرحلة الثالثة): طويلة (أكثر من 600 µ)، مؤنفة الذيل (الشكل 25: D)، نسبة المري إلى المعي متساوية 1:1. توجد في التربة وتدخل إلى المضيف عن طريق الجلد. يمكن أن تشاهد في العينات التنفسية في الإصابة الذاتية autoinfection.



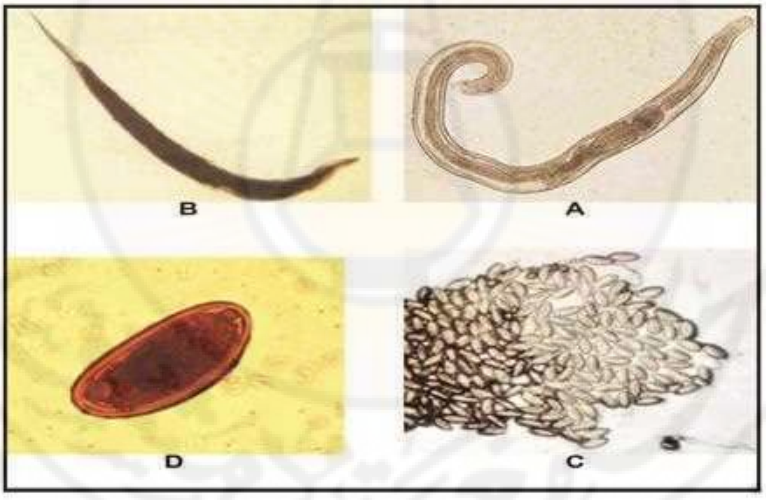
الشكل 25: الإسطوانية البرازية: A- الذكر (الشوكة السفادية "السهم")، B- الأنثى (لاحظ البيوض)، C- المرحلة اليرقانية الأولى في عينة برازية (القناة الفموية "السهم الأخضر" - المري المنتفخ "السهم الأحمر" - بداءة الجهاز التناسلي "السهم الأزرق")، D- المرحلة اليرقانية المعدية في عينة برازية (النهاية مؤنفة)

4- السرمية الدويدية (الحرقص) *Enterobius vermicularis*

الديدان البالغة: حبلية، صغيرة الحجم، منفصلة الجنس (الأنثى أكبر حجماً "8–15 × 0.3–0.5 ملم" من الذكر "2–4 × 0.1–0.2 ملم")، النهاية الخلفية للذكر معقوفة ومزودة بشوكة، والنهاية الخلفية للأنثى مخروطية مدببة (الشكل 26: A–B).

البيوض: بيضوية الشكل (50–60 × 20–30 µ) غير متناظرة (أحد الجوانب مسطح)، محاطة بقشرة مضاعفة ملساء (الشكل 26: D) بداخلها يرقة منثنية ومكتملة النمو معدية.

يُستعمل الشريط اللاصق scotch tape (الشكل 26: C) للحصول على ديدان السرمية الدويدية (الحرقص) التي تهاجر إناثها أثناء الليل إلى المنطقة الشرجية لوضع البيوض حول تلك المنطقة، لذلك يُفضل أخذ العينات المسائية أو الصباحية الباكرة (قبل استعمال الحمام).



الشكل 26: السرمية الدويدية: A– ذكر، B– أنثى (لاحظ: النهاية الأمامية المتماثلة في كلا الجنسين، النهاية الخلفية المختلفة فيهما)، C– بيوض السرمية الدويدية على شريط السيلوفان اللاصق، D– بيضة جنينية (لاحظ: عدم التناظر، اليرقة).

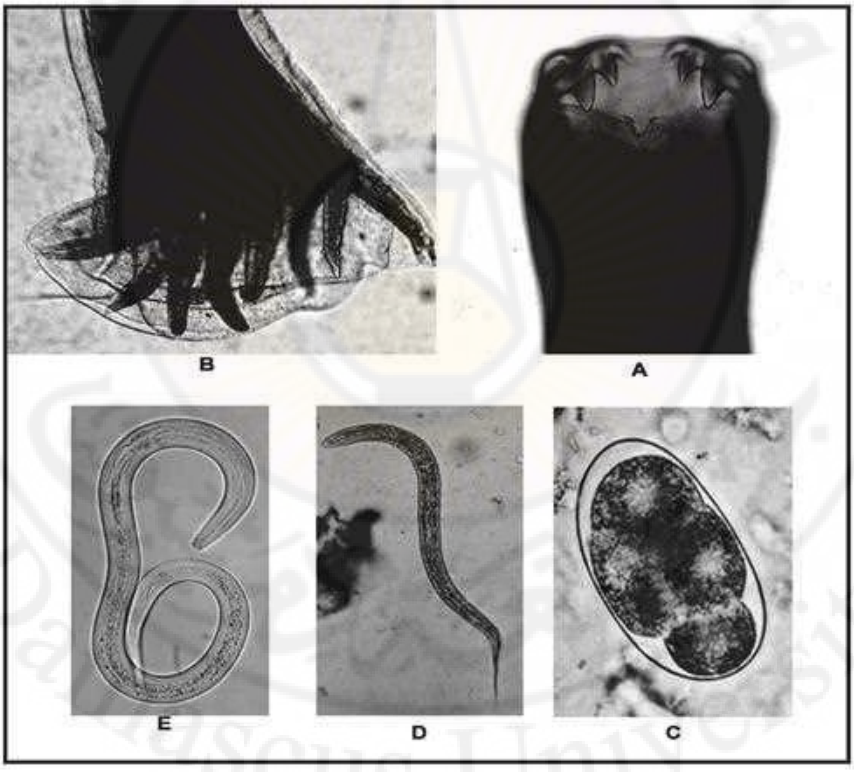
خطوات العمل:

– وضع قطعة من الشريط اللاصق في المنطقة الشرجية مع الضغط عليها بلطف.

– نزع القطعة وقلبها لتوضع على شريحة زجاجية نظيفة مع الضغط عليها بلطف بواسطة قطعة قطنية أو قطعة من الشاش تمهيداً لفحصها مجهرياً. ولجعل الرؤية أكثر وضوحاً يمكن وضع قطرة محلول ملون أو كزيلول بين سطح الصفيحة والقطعة اللاصقة.

5- الملقوات العفجية *Ancylostoma duodenale*

الدودة البالغة: إسطوانية، منفصلة الجنس (الذكر أقصر "8–12 ملم" من الأنثى "10–15 ملم")، تحوي النهاية الأمامية في كلا الجنسين (الشكل 27: A) محفظة فموية كيتينية فيها زوجان من الكلاليب وأحيانا أسنان، النهاية الخلفية الذكرية مزودة بجراب أو كيس إلقاح (الشكل 27: B) تخرج منه زائدتان تناسليتان، النهاية الذكرية الأنثوية مخروطية مستقيمة.



الشكل 27: الملقوات العفجية: A– النهاية الأمامية للدودة البالغة في كلا الجنسين (لاحظ الأسنان)، B– النهاية الخلفية للذكر، C– البيضة (لاحظ: الكتل الجنينية، القشرة الملساء)، D– اليرقة الريدية، E– اليرقة المغمدة المعدية .

البيوض: لا يمكن تمييز بيوض الديدان الكلابية عن بعضها بعضاً. فهي بشكل عام، بيضوية الشكل متناظرة (حجمها 60-75 × 35-40 µ)، محاطة بقشرة رقيقة ملساء، بداخلها كتل جنينية مفصولة عن القشرة بفراغ نير وتطرح مع البراز (الشكل 27: C).

اليرقة الربدية (المرحلة الأولى) Rhabditiform larva: تخرج من البيوض، حجمها 250-300 × 15-20 µ، تحوي قناة فموية طويلة وبداءة جهاز تناسلي (الشكل 27: D). عادة لا توجد في العينة البرازية (ولكن عند التأخر بإجراء فحص العينة وتركها في حرارة الغرفة يمكن أن تشاهد اليرقات في العينة البرازية وعندها يجب تمييزها عن يرقة الإسطوانية البرازية).

اليرقة الخيطية filariform larva المغمدة المعدية (المرحلة الثالثة): طويلة (500-600 µ)، نهايتها مؤنفة، محاطة بغمد مخطط (الشكل 27: E)، توجد في التربة وتدخل إلى المضيف عن طريق الجلد.

التطبيق العملي

- **حيات البطن *Ascaris***: دراسة مقطع عرضي في الديدان البالغة (ذكر، أنثى) للتعرف على الأعضاء الداخلية والتعرف على البيوض مع الرسم.
- **الشعرية *Trichuris***: يُطلب ملاحظة الفرق بين الذكر والأنثى (النهاية الأمامية والخلفية) ، البيوض مع الرسم.
- **الاسطوانية *Strongyloide***: يُطلب ملاحظة الفرق بين الذكر والأنثى (المري في النهاية الأمامية، والنهاية الخلفية)، اليرقات مع الرسم.
- **السرمية *Enterobius***: يُطلب ملاحظة الفرق بين الذكر والأنثى (الطول والشكل وملاحظة البلعوم بالجنسين)، البيوض الجنينية الحاوية على اليرقات مع الرسم.
- **الملقوات *Ancylostoma***: يُطلب ملاحظة النقاط الآتية مع الرسم: الفرق بين الذكور والإناث من ناحية الطول والشكل الخارجي. والفم المجهز بأسنان قاطعة، الفرق بين نهايتي الذكر والأنثى، البيوض، اليرقات الإسطوانية المغمدة.

الفصل الثاني

تشخيص الأخماج الطفيلية الدموية

Hematozoa Infection Diagnosis

يفيد فحص اللطاخة الدموية في الكشف عن العديد من الإصابات الطفيلية كالملاريا أو البرداء malaria والبابيزيا Babesiosis والداء المثقبي الإفريقي African trypanosomiasis والأمريكي American trypanosomiasis والخيطيات filariasis وغيرها، وللحصول على العينة المطلوبة للفحص بشكل جيد لا بد من مراعاة بعض النقاط الآتية:

1- زمن جمع العينة

يجب أن يتم جمع العينة قبل البدء بأي معالجة دوائية، كما يجب فحص لطاخات الدم المحضرة من العينة مباشرة ودون أي تأخير عند الشك بالإصابة بالملاريا أو البابيزيا، وبما أنّ شدة الإصابة بهذه الطفيليات متغيرة، يُنصح بتحضير عدة شرائح بفارق زمني من 8 إلى 12 ساعة خلال يومين إلى ثلاثة أيام.

أما بالنسبة للخيطيات الدقيقة الدموية التي تظهر في فترات محددة في دم المصاب (تبعاً للنوع) يكون الوقت الأمثل للحصول على العينة الدموية من الساعة العاشرة صباحاً وحتى الثانية ظهراً (الخيطية اللوية *Loa loa*) وبعد الساعة الثامنة مساء وحتى الرابعة صباحا (الخيطية البنكروفتية *Wuchereria bancrofti* والخيطية المالاوية *Brugia malayi*) وفي أي وقت من اليوم (الخيطية الكلابية).

2- الحصول على العينة

تكون عينات الدم الوريدية كافية لإجراء العديد من الاختبارات التشخيصية من بينها طريقة التكثيف (للكشف عن الخيطيات، المثقبيات). إلاّ أنه وفي بعض الحالات (عند الإصابة بالملاريا مثلاً) يؤثر مانع التخثر الذي يوضع مع عينة الدم الوريدية على الشكل

المورفولوجي للطفيلي وعلى صفاته اللونية، لذلك يكون الحصول على عينات دم من الأوعية الشعرية هو المفضل.

*** الحصول على الدم الشعري من الإصبع:**

- استعمال شرائح زجاجية ممسوحة بالكحول وجافة تماماً (يكتب عليها اسم المريض وزمن الحصول على العينة وتاريخه).

- بعد مسح الإصبع (الثالثة أو الرابعة) جيداً بالكحول وتركها لتجف تماماً، تُثقب باستعمال أداة ثقب معقمة ويتم التخلص من القطرتين الأولى والثانية، لتوضع القطرة الثالثة على الشريحة النظيفة (عادة يتم تحضير شريحتين لطاخة سميكة وشريحتين لطاخة رقيقة).

*** الحصول على عينة من الدم الوريدي:**

يتم الحصول على الدم الوريدي باستعمال مخلية هواء وأنابيب تحوي مضاد تخثر (EDTA) يجمع الدم فيها مباشرة أو باستعمال محاقن عقيمة يؤخذ فيها الدم ثم يُفرغ في أنابيب تحوي مضاد تخثر وتُمزج جيداً. يحضر من هذا الدم أيضاً شريحتين لطاخة سميكة وشريحتين لطاخة رقيقة مباشرة بعد الجمع (لأنّ التأخر في ذلك يسبب تشويهاً في الشكل المورفولوجي للطفيلي وفي خصائصه اللونية بسبب مانع التخثر).

3- طرق تحضير اللطاخات

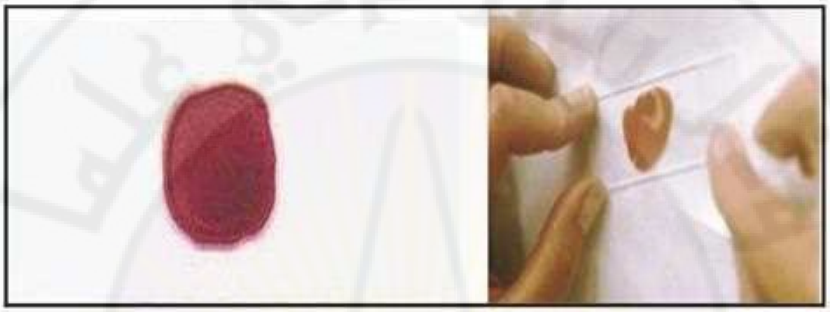
آ- اللطاخات السميكة thick smears:

تتألف من طبقة سميكة من كريات الدم الحمراء المنحلة، وتفيد في مشاهدة الطفيلي (في حال وجوده بأعداد قليلة) فقط ولا تسمح بالتعرف على تفاصيل شكله المورفولوجي. يتم تحضير هذه اللطاخات تبعاً للخطوات الآتية (الشكل 28):

- وضع قطرة أو قطرتين من الدم في منتصف شريحة زجاجية ممسوحة بالكحول وجافة تماماً.

– نشر أو مد القطرة بحركة دائرية باستعمال عود بلاستيكي (أو حافة صفيحة أخرى) ليصل قطرها النهائي إلى 1.5 سم تقريباً (مع الاستمرار بالتحريك لمنع تشكل خثرة).

– وضع الشريحة بشكل أفقي وتركها لتجف تماماً على الأقل لمدة 30 دقيقة، بعيداً عن الغبار والحشرات (تحتاج عادة لعدة ساعات في درجة حرارة الغرفة، ولتسريع ذلك يمكن استعمال المروحة أو نظام التبريد في مجفف الشعر).

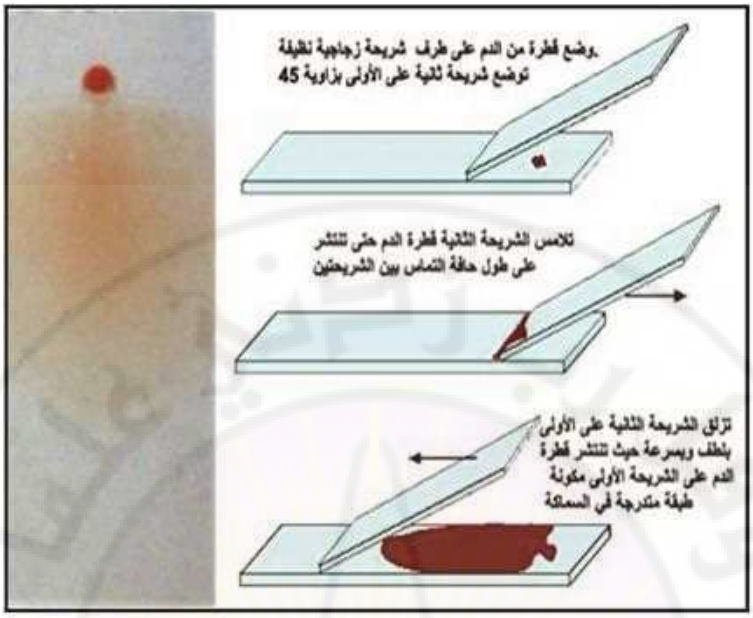


الشكل 28: طريقة تحضير لطاخة الدم السميكة

– عدم اللجوء على الإطلاق إلى تسخين الشريحة أو تثبيتها بالميتانول methanol (لأنّ التثبيت يؤدي إلى بقاء الكريات الحمراء كاملة مما يعيق مشاهدة الطفيليات، ولا بد من الإشارة إلى ضرورة تغطيس الشريحة في الماء المقطر لفترة زمنية قصيرة لحل كريات الدم الحمراء عند التأخر في إجراء عملية التلوين.

ب– اللطاخات الرقيقة thin smears:

تفيد في الفحص المجهري والتعرف على الشكل المورفولوجي للطفيليات (كالمثقبيات *Trypanosoma* والمتصورات *Plasmodium* والليشمانية *Leishmania* وغيرها) ويعتمد تحضيرها على حجم قطرة الدم ومقدار الزاوية بين الشريحتين الزجاجيتين والسرعة التي تُزلق فيها الشريحة الثانية على الأولى (الشكل 29).



الشكل 29: الخطوات المتبعة في تحضير اللطاخة الدموية الرقيقة

أخيراً تجفف الشريحة في الهواء بدرجة حرارة الغرفة (بعيداً عن الغبار والحشرات) وتُثبت بالميتانول قبل التلوين.

4- طريقة التثفيل الثلاثي:

تستعمل هذه الطريقة في الكشف عن المثقبيات *Trypanosoma* في العينة الدموية للمصاب، وتشتمل على الخطوات الآتية:

- يثفل من 5 إلى 10 مل من الدم المضاف إليه سيترات الصوديوم (مانع تخثر) لمدة 5 دقائق على السرعة 2000 دورة/د.

- تُنقل البلاسما الدموية (المصل الطافي) وطبقة الكريات البيض إلى أنبوب آخر ومن ثمّ تُثفل على السرعة 2000 دورة/د لمدة دقيقتين.

- يُنقل المصل الطافي إلى أنبوب آخر ويعاد التثفيل لمدة 10 دقائق، على السرعة 5000 دورة/د.

– يزال السائل الطافي، وتؤخذ قطرة من الراسب لتفحص إما مباشرة تحت المجهر أو بعد تثبيتها وتلوينها بغيمزا.

5– طرائق مستعملة في الكشف عن الخيطيات الدقيقة الدموية

يؤخذ الدم الشعري من الإصبع (حيث تتكثف الخيطيات الدقيقة في الأوعية الدموية الشعرية المحيطية) لتحضير لطاخات سميكة ورقيقة. في حين تُعامل عينة الدم المأخوذة من الوريد والممزوجة مع مانع تخثر (EDTA) بإحدى الطرق الآتية:

آ– طريقة التثفيل Knott's method:

– مزج 9 مل من محلول الفورم ألدهيد (2%) مع 1 مل من الدم الوريدي.

– تثفيل المزيج على السرعة 3000 دورة /د لمدة 10 دقائق ثم إزالة الطافي.

– تحضير إما عينة رطبة بأخذ قطرة من الراسب، لفحصها سريعاً تحت المجهر (يتألف الراسب من كريات بيض وبرقات خيطية دقيقة في حال وجودها) أو لطاخة سميكة و أخرى رقيقة لتلوينها بملون غيمزا.

ب– طريقة المحلول الملحي/ saponin:

مزج 2 مل من الدم (حديث الجمع أو مضاف إليه مانع تخثر) مع 8 مل من الـ saponin الممدد في محلول ملحي (1%) جيداً، ثمّ ترك المزيج ليهدأ مدة 15 دقيقة. تثفيل المزيج لمدة 15 دقيقة على السرعة 2000 دورة/ د وإزالة الطافي واخذ الراسب لتحضير إما عينة رطبة تُفحص مباشرة أو عينة مثبتة وملونة.

ج– طريقة الترشيح:

بعد مزج 1 مل من الدم الوريدي جيدا مع 10 مل إما من محلول Teepol 610 أو من محلول ملحي 10% (لحل كريات الدم) ، يترك المزيج ليهدأ لمدة 15 دقيقة، ثمّ يُنقل إلى محقن حامل لمرشح Millipore filter (نفوذيته 5 ميكرون). وبعد تمرير المحلول عبر المرشح، يُغسل هذا الأخير عدة مرات بالماء المقطر.

يمكن تحضير عينة رطبة مؤقتة عن طريق وضع محتوى المرشح على شريحة زجاجية نظيفة ومزجها مع قطرة ملون لفحصها تحت المجهر بعد تغطيتها بساترة زجاجية، كما يمكن تحضير عينة دائمة عن طريق تمرير 2 – 3 مل من الميتانول عبر المرشح لتثبيت محتواه الذي يلون بمحلول غيمزا بعد تحريره وتجفيف محتواه على شريحة زجاجية نظيفة.

6- طرائق التلوين

لتسهيل عملية التشخيص والفحص المجهري للطفيليات الدموية، يتم تلوين اللطاخات (السميكة والرقيقة) إما بملون رايت (يكون المثبت والملون في المحلول نفسه) أو بملون غيمزا شائع الاستخدام (يكون المثبت منفصل عن الملون وبالتالي لا بد من تثبيت اللطاخة الرقيقة خاصة قبل تلوينها) ويجب أن يتم التلوين خلال 24 ساعة من تحضير اللطاخة.

آ- التلوين بملون غيمزا Geimsa stain:

تحضير الكواشف:

- دارئة غيمزا (المحلول الأم ×100) M 0.67:

59.24 غ Na2HPO4 + 36.38 غ NaH2PO4H2O + 1000 مل ماء ثنائي التقطير. تُحفظ بدرجة حرارة الغرفة لمدة سنة وعند الاستعمال تمرر الدارئة على مراشح عقيمة (µ0.2) أو تعقم بالموصد.

- دارئة العمل (M 0.0067): 10 مل محلول أم + 990 مل ماء ثنائي التقطير. تعاير درجة حموضتها pH = 7.2 ، تحفظ بدرجة حرارة الغرفة وتكون صالحة لمدة شهر.

- محلول Triton X-100 (5%): 5 مل Triton X-100 + 95 مل ماء ثنائي التقطير ساخن. يضاف الـ Triton ببطء مع التحريك.

- ملون غيمزا (المحلول الأم): 30 غ حبيبات زجاجية + 270 مل ميتانول مطلق + 3 غ ملون غيمزا + 140 غليسرول. تخلط جميع المواد السابقة (حسب ترتيبها) في زجاجة مغشاة عاتمة، التي توضع بشكل مائل على جهاز تحريك لمدة 30 أو 60 دقيقة يومياً

(لمدة 14 يوماً)، وقبل الاستعمال تُرشح الكمية المطلوبة من المحلول الأم على ورق ترشيح #1. يحفظ المحلول بدرجة حرارة الغرفة.

- محلول العمل (ملون غيمزا 2.5%): 39 مل محلول العمل (دارئة غيمزا) + 1 مل محلول أم (غيمزا) + 2 نقطة من محلول Triton X-100.

خطوات التلوين:

- تحضير اللطاخة الدموية (السميكة والرقيقة كما ورد أعلاه) وتجفيفها بالهواء. ثمّ تثبيت اللطاخة الرقيقة فقط بالميتانول لمدة 30 أو 45 ثانية تقريباً.
- غمر الشريحة (السميكة أو الرقيقة) بمحلول غيمزا (2.5%) لمدة تتراوح بين 45 و 60 دقيقة (أو محلول ممدد بنسبة 10:1 في دارئة غيمزا، مدة التلوين 10 دقائق، أو بنسبة 20:1 في نفس الدارئة مدة التلوين 20 دقيقة).
- غسيل اللطاخة الرقيقة من 3 إلى 4 مرات في دارئة غيمزا المضاف إليها قطرتان من محلول Triton X-100، في حين تُترك اللطاخة السميكة في المحلول نفسه لمدة 5 دقائق.
- تجفيف الشريحة بالهواء وبدرجة حرارة الغرفة بشكل شاقولي تمهيداً لفحصها مجهرياً باستعمال العدسة الغاطسة.

نتيجة التلوين: تتلون الكريات الحمر بالأزرق أو الرمادي الفاتح، و الكريات البيض تتلون نواتها بالبنفسجي الغامق والسيتوبلاسما بالبنفسجي الفاتح (تتلون الحبيبات الحامضية في الحمضات بالأحمر أو البنفسجي، في حين تتلون الحبيبات القلوية في الأسسات بالبنفسجي أو الزهر الغامق)، أما الطفيلي فيأخذ اللون البنفسجي المائل للزرقة والنواة فيه حمراء اللون.

ب- التلوين بملون Field:

يُنصح باستعمال هذا الملون في تلوين لطاخات الدم، ويتألف Field's stain من مزيجين: الأول محلول موقي لملون azur (Field's stain A) والثاني محلول موقي لملون الإيوزين eosine (Field's stain B). ويتم تلوين اللطاخات السميكة كما يأتي:

بعد تحضير لطاخة الدم السميكة بالطريقة المذكورة أعلاه وتجفيفها جيداً بالهواء، تُغطس في محلول Field A لمدة ثلاث ثواني ومن ثمّ تُغسل بماء الصنبور لمدة ثلاث ثواني، فيما بعد، تُغطس الشريحة في محلول Field B لمدة ثلاث ثواني ومن ثمّ تُغسل بالماء (كما ورد في الخطوة السابقة)، أخيراً تُجفف بوضعها شاقولياً تمهيداً للفحص المجهري.

أما بالنسبة لتلوين اللطاخة الرقيقة فيتم تطبيق طريقة التلوين السريع بملون Field بعد التعديل (تفيد من أجل الكشف عن طفيلي المتصورات *Plasmodium*، البابيزيا *Babesia*، الليشمانية *Leishmania*). يجري التلوين كما يأتي: بعد تحضير لطاخة الدم الرقيقة (بالطريقة المذكورة أعلاه وتجفيفها جيداً بالهواء) تُثبت بالميتانول لمدة دقيقة، ومن ثمّ تُغمر بـ 1 مل من محلول Field B الممدد في الماء المقطر (بنسبة 4:1)، التي يُضاف إليها مباشرة حجم مماثل (1 مل) من ملون Field A (غير الممدد)، يُمزج جيداً ويترك لمدة 1 دقيقة، أخيراً تُغسل الشريحة جيداً بالماء العادي وتترك لتجف ليتم فحصها مجهرياً.

ج- التلوين بملون بالهيماتوكسيلين:

على الرغم من جودة ملون غيمزا في تلوين اللطاخات الدموية إلاّ أنّ بعض المختبرات تُفضل استعمال الهيماتوكسيلين في تلوين الخيطيات الدقيقة الدموية لأنه يساعد في إعطاء تفاصيل مورفولوجية لليرقة (خاصة بالنسبة للغمد).

تحضير الملون Mayer's hematoxylin:

50 غ أمونيوم أو ألمنيوم البوتاسيوم + 1 غ بلورات الهيماتوكسيلين + 0.2 غ يودات الصوديوم + 1 غ حمض الليمون + 50 غ هيدرات الكلورال chloral hydrate + 1000 مل ماء مقطر. تُذاب الكميات السابقة في الماء المقطر جيداً، يكون لون المحلول عادة بنفسجياً مائلاً إلى الاحمرار.

آلية التلوين:

بعد معالجة اللطاخة السميكة بحمض كلور الماء (0.5%) لحل الكريات، وغسلها بمحلول فحمات الليتيوم (1%)، تلون بملون الهيماتوكسيلين لمدة 15 دقيقة، و تُغسل جيداً في الماء المقطر وتجفف تمهيداً لدراستها تحت المجهر.

قبل البدء باستعراض أمثلة عن الطفيليات الدموية لا بد من فحص لطاخة دم طبيعية (ملونة بغيمزا) مجهرياً والتعرف على أنماط الخلايا الموجودة فيها (الشكل 30).

آ- **الكريات الحمر erythrocytes**: خلايا صغيرة قرصية مقعرة الوجهين، لا تحوي نواة، ذات لون بصلي في المحيط وشاحب في المركز لنقص الهيموغلوبين.

ب- **الكريات البيض leukocytes**: خلايا كبيرة الحجم تحوي سيتوبلاسماها على نواة مفردة أو مفصصة، لها عدة أنواع:

- العدلات neutrophiles:

كروية الشكل، محيطها منتظم، تحوي سيتوبلاسماها حبيبات ناعمة (تتلون بين الأحمر والبنفسجي) ونواة مؤلفة من ثلاثة إلى أربعة فصوص (بنفسجية اللون).

- الأسسات basophiles:

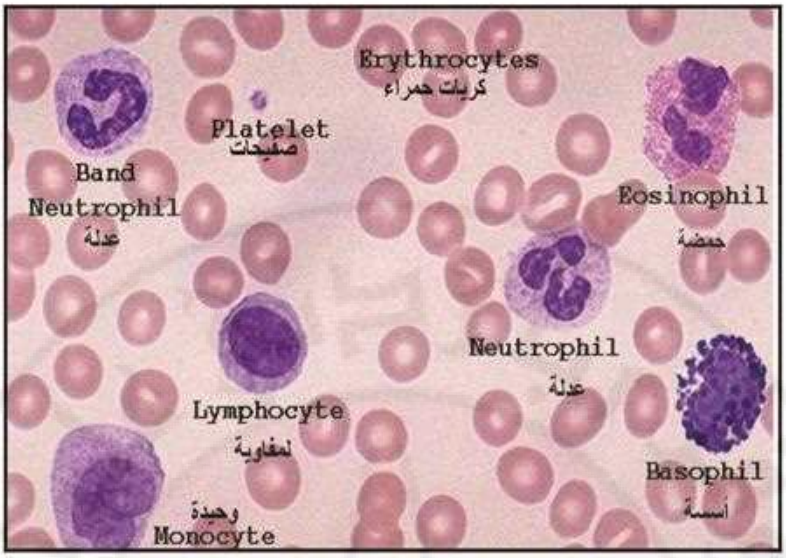
كروية الشكل، محيطها منتظم، تحوي سيتوبلاسماها حبيبات صغيرة غير منتظمة الشكل والتوزع (لونها بنفسجي قاتم) ونواة متقسمة بشكل غير منتظم.

- الحمضات eosinophiles:

كروية الشكل، محيطها منتظم، تحوي سيتوبلاسماها حبيبات كبيرة الحجم ومتراصة تملأ الخلية (تتلون بالأحمر) ونواة ذات فصين غالباً، بداخلها كروماتين كثيف (يتلون بالبنفسجي).

- الوحيدات monocytes:

كبيرة الحجم، كروية الشكل، محيطها غير منتظم، تحوي سيتوبلاسماها حبيبات ناعمة (تتلون بالبنفسجي) ونواة تأخذ أشكالاً متعددة (شكل الكلية، أو دائري، أو شكل نعل الفرس) وبداخلها كروماتين (يتلون بالبنفسجي الفاتح)



الشكل 30: لطاخة دموية رقيقة ملونة بغيمزا وفيها تظهر كريات الدم الحمراء وأنواع الكريات البيض والصفيحات

- اللمفاويات lymphocytes:

منها الصغيرة المشتملة على نواة كبيرة الحجم كروية الشكل (تتلون بالبنفسجي) وسيتوبلاسما قليلة خالية من الحبيبات (تتلون بالأزرق الفاتح)، ومنها الكبيرة التي محيطها غير منتظم وتحوي على نواة صغيرة الحجم وسيتوبلاسما فيها عدد قليل من الحبيبات (تتلون بالأزرق).

ج- الصفيحات الدموية platelets: أجسام صغيرة الحجم، محيطها مشرشر غير منتظم، غير محاطة بغلاف، لا تحوي نواة، سيتوبلاسماها ضئيلة (تتلون بالأزرق الفاتح) وتحيط بمجموعة من الحبيبات مركزية التوضع.

التطبيق العملي

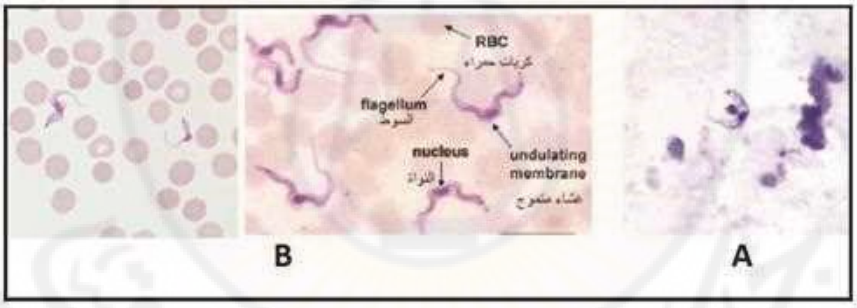
المطلوب تحضير لطاخات دم رقيقة من أجل تثبيتها وتلوينها تمهيداً لفحصها مجهرياً وتحديد أنواع الخلايا الموجودة فيها ورسمها.

دراسة بعض الأنواع الطفيلية

أولاً: السوطيات الدموية Hemoflagellate

1- المثقبي البروسي *Trypanosoma brucei*

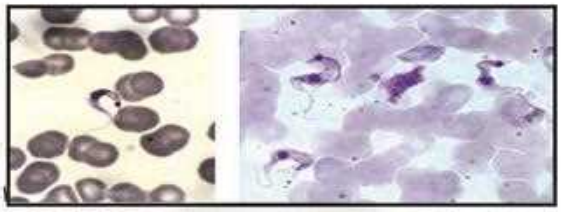
يُعرف لهذا النوع تحت نوعين المثقبية البروسية الغمبية *T. b. gambiense* والمثقبية البروسية الروديسية *T. b. rhodesiense* لا يمكن تمييزهما من الناحية الشكلية. يأخذ الطفيلي في الدم المحيطي عند الإنسان شكلاً مغزلياً متطاولاً (الشكل 31)، يتراوح طوله بين 14 و 33 µ، تتوضع النواة فيه في المنتصف تقريباً وتكون سيتوبلاسماه حبيبية وتقع صانعة السوط ذات الشكل البيضوي والحجم الصغير في النهاية الخلفية البعيدة للطفيلي، ويصدر منها سوط يشكل مع جدار الجسم غشاء متموجاً ينتهي في نهاية الطفيلي الأمامية بسوط حر. يتكاثر بالانشطار الثنائي.



الشكل 31: المثقبي البروسي في لطاخات دم ملونة بغيمزا: سميكة (A)، رقيقة (B).

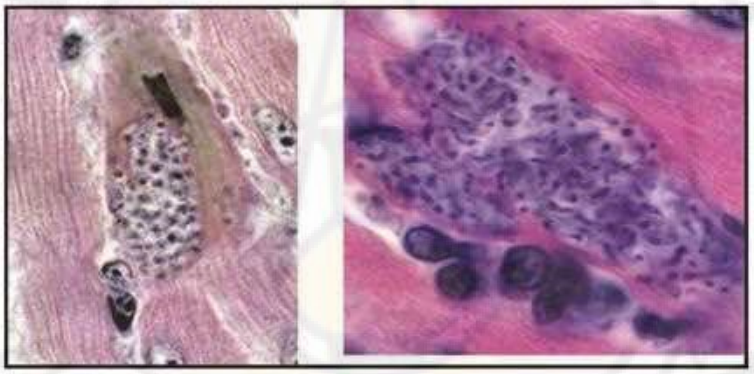
2- المثقبي الكروزي *Trypanosoma cruzi*

يشاهد في دم المضيف الشكل المغزلي المتطاول ويتراوح طوله بين 12 و 30 µ، سيتوبلاسماه حبيبية تحوي نواة كبيرة الحجم وصانعة محركة منتفخة ومتوضعة في النهاية الخلفية لجسم الطفيلي (أو قريبة منها)، ويكون الغشاء المتموج قليل النمو، والسوط قصير نسبياً، و يظهر هذا الطفيلي في العينة المفحوصة، منحني على شكل حرف C أو U (الشكل 32).



الشكل 32: المثقبي الكروزي في لطاخة دم رقيقة ملونة بغيمزا. لاحظ شكل الطفيلي المنحني C، الصانعة المحركة قريبة من النهاية الخلفية

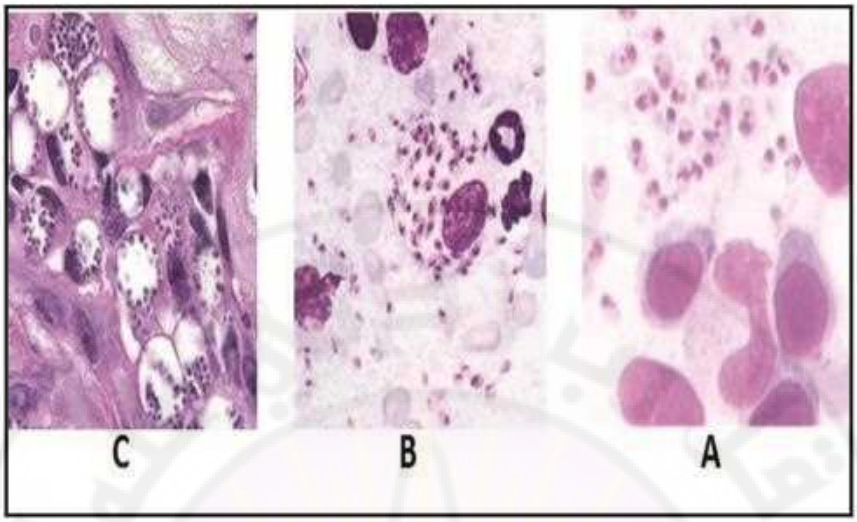
تُشاهد في نسج المضيف المختلفة (خاصة العضلات) أكياس كاذبة تحوي أشكال ليشمانية صغيرة الحجم (2 – 4 µ)، عديمة السوط غير متحركة (الشكل 33)، قادرة على الانشطار والتكاثر.



الشكل 33: الأشكال عديمة السوط للمثقبي الكروزي في مقاطع نسيجية لعضلة القلب ملونة بالهيماتوكسيلين- الإيوزين.

3- جنس الليشمانية *Leishmania*

يُعرف لهذا الجنس أنواع طفيلية عديدة، البعض منها يسبب الإصابة بالداء الجلدي (معقد طفيلي الليشمانية المدارية *L. tropica complex*) والبعض الآخر الإصابة بالداء الحشوي (معقد طفيلي الليشمانية الدونوفانية *L. donovani complex*) وهناك أنواع مسؤولة عن الإصابة الجلدية المخاطية (معقد طفيلي الليشمانية البرازيلية *L. braziliensis complex*).



الشكل 34: الأشكال عديمة السوط لطفيلي الليشمانية: في بلاعم من كشاطة جلدية (A) وفي عينة بزل نقي عظم (B) ملونة بغيمزا وفي مقاطع نسيجية لقرحة جلدية (C) ملونة بالهيماتوكسيلين- الإيوزين. لاحظ: النواة والصانعة المحركة، التوضع النموذجي للطفيلي على محيط الفجوات في المقطع النسيجي

تأخذ هذه الطفيليات عند المضيف الفقاري (الإنسان) بشكل عام أشكال ليشمانية عديمة السوط، كروية أو بيضوية الشكل (حجمها 1-5 × 1-2 µ)، تحوي سيتوبلاسماها (الملونة بالأزرق) نواة كبيرة (تتلون بالأحمر) وصانعة محركة وبداءة سوط (الشكل 34). تشاهد هذه الأشكال داخل خلايا الجهاز الشبكي البطاني (وأحياناً خارجها بسبب انفجار الخلية المصابة).

يمكن رؤية هذه الأشكال في الكشاطات الجلدية cutaneous scraping (التي تؤخذ باستعمال إبرة المحقن بعد نزع القشرة التي تعلو التقرح الجلدي، ومن ثمّ تُفرش على شريحة زجاجية نظيفة وتجفف جيداً ليتم تثبيتها بالميتانول وتلوينها بملون غيمزا) والخزعات النسيجية الجلدية Histological biopsies (عند الإصابة بالداء الجلدي)، وفي بزل aspirate لنقي العظم Bone marrow والطحال والخزعات النسيجية للكبد والطحال والعقد اللمفاوية (عند الإصابة بالداء الحشوي). لا يمكن التمييز بين هذه الأنواع الطفيلية مجهرياً.

التطبيق العملي

- التعرف على جنس المثقبيات من خلال مشاهدة شكل الجسم والغشاء المتموج والسوط إضافة إلى النواة والصانعة المحركة ومكان توضعهما. مطلوب الرسم

- التعرف على جنس الليشمانية من خلال رؤية الشكل عديم السوط داخل البلاعم، يحوي نواة كبيرة نسبياً وبداءة السوط، ومشاهدة الشكل أمامي السوط وفيه نواة كبيرة نسبياً وصانعة محركة أمام النواة يصدر عنها السوط. مطلوب الرسم

ثانياً: البذيريات Sporozoa

تتطفل البذيريات الدموية على الإنسان (تعاني من دورتين تطوريتين لا جنسيتين: الأولى خارج دموية في الكبد، والثانية داخل دموية في الكريات الحمراء) وتنتقل من مضيف إلى آخر عن طريق العامل الحشري الناقل (تعاني من دورة تطور جنسية) ، يحوي هذا الصف عدة أجناس (كالمتصورات *Plasmodium* والبابيزيا *Babesia* وغيرها) يشتمل كل منها على عدة أنواع.

1- جنس المتصورات *Plasmodium*

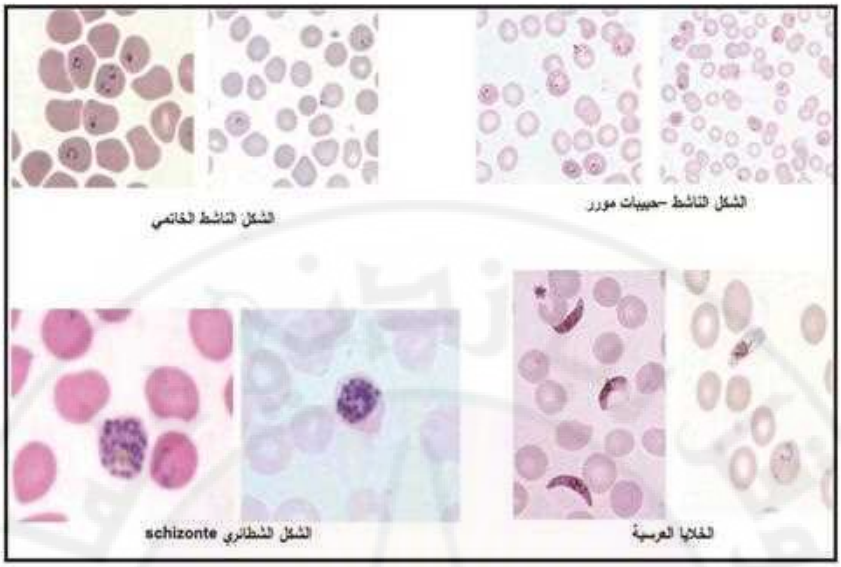
يمر هذا الطفيلي بشكل عام، بعدة مراحل تطورية داخل كريات الدم الحمراء للمضيف.

*** المتصورات المنجلية *P. falciparum*:**

يبيّن الشكل 35 جميع المراحل المختلفة التطورية لهذا الطفيلي:

الشكل الناشط الخاتمي الفتي immature ring form: حلقي الشكل، يشغل خمس حجم الكرية الحمراء المصابة (لا يلاحظ زيادة في حجمها بالمقارنة مع حجم الكرية السليمة)، يمتلك بقعة أو بقعتين من الكروماتين.

الشكل الناشط الخاتمي الناضج mature ring form: يزداد حجم السيتوبلاسما وتصبح أشد كثافة، وتحوي الكرية المصابة على حبيبات مورر Maurer's clefts (كبيرة الحجم وخشنة).



الشكل 35: الأشكال التطورية المختلفة لطفيلي المتصورات المنجلية.

الشكل الشطائري (المتقسمة) schizonte: نادراً ما يشاهد في الدم المحيطي لدى المصابين بالمتصورات المنجلية (إلاّ في حالات الإصابة الشديدة)، يحوي هذا الشكل من 8 إلى 24 أقسومة، ويشغل حوالي ثلثي حجم الكرية الحمراء المصابة عند نضجه.

الخلايا العرسية gamete cells: هلالية الشكل (حجمها كبير نسبيا ويعادل طولها مرة ونصف قطر حجم كرية حمراء)، تكون سيتوبلاسما الخلية العرسية الكبرى (المؤنثة) macrogamete زرقاء اللون والبقع الصباغية والكروماتينية متجمعة وكثيفة، في حين تكون سيتوبلاسما الخلية العرسية الصغرى (المذكرة) microgamete زهرية اللون والبقع الصباغية والكروماتينية مبعثرة. تشاهد أحياناً آثار من الكرية الحمراء المصابة التي تشكل مع الخلية العرسية شكلاً يُعرف بـ "Lavernan's bib".

***المتصورات النشيطة *P. vivax*:**

يبيّن الشكل 36 المراحل التطورية المختلفة لهذا الطفيلي:

الشكل الناشط الخاتمي الفتي immature ring form: حلقي الشكل، سيتوبلاسماه كثيفة وفيها بقعة كروماتينية (نواة) واحدة.

الشكل الناشط الناضج mature ring form: متحولي الشكل، يحوي فجوة كبيرة (أو فجوات)، وتظهر حبيبات شوفنر Schüffner's dots في الكرية الحمراء المصابة (يكون حجمها أكبر من حجم الكرية السليمة). الشكل الشطائري schizonte: كبير الحجم نسبياً متحولي الشكل ويحوي من 12 إلى 24 أقسومة، تحوي كل منها على بقعة كروماتين (نواة) وكتلة من السيتوبلاسما، تكون البقع الصباغية الملارية غالباً في المركز. حجم الكرية المصابة أكبر من الكرية السليمة وتحوي حبيبات شوفنر.

الخلايا العرسية gamete cells: كروية أو بيضوية الشكل، تشغل حيز الكرية الحمراء المصابة كاملاً (تظهر فيها حبيبات شوفنر). تتلون سيتوبلاسما الخلية العرسية المؤنثة بالأزرق الغامق وتحوي بقعة صباغية ملارية ملونة بالبني ونواة صغيرة الحجم، في حين تتلون سيتوبلاسما الخلية العرسية المذكرة بالزهر أو الأزرق الشاحب وتحوي نواة كبيرة الحجم. .

الشكل 36: الأشكال التطورية المختلفة لطفيلي المتصورات النشيطة. لاحظ الحجم الكبير نسبياً للكرية المصابة، حبيبات شوفنر.

* **المتصورات البيضاوية *P. ovale*:**

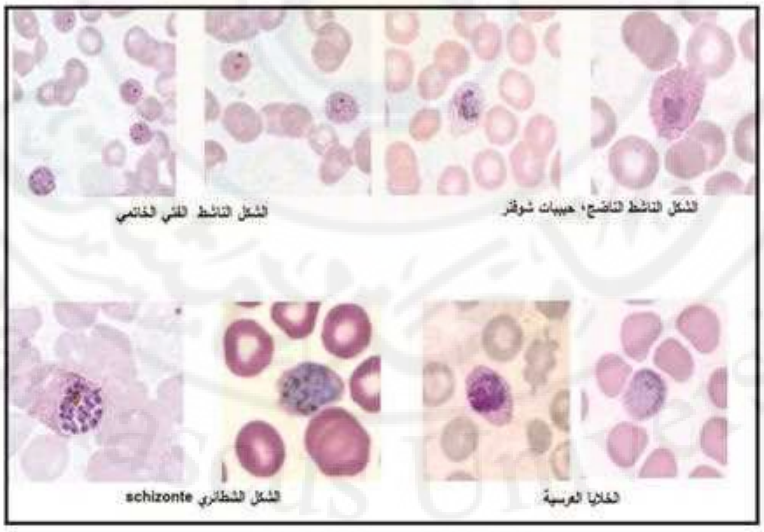
يبيّن الشكل 37 المراحل التطورية المختلفة لهذا الطفيلي في المضيف الفقاري:

الشكل الناشط الخاتمي الفتي immature ring form: تحوي سيتوبلاسماه السميكة بقعة كروماتينية كبيرة أو نواة واحدة (أحياناً بقعتين).

الشكل الناشط الناضج mature ring form: متحولي الشكل، قد يحوي بعض الفجوات والبقع الصباغية فيه دقيقة ومبعثرة. يكون للكرية الحمراء المصابة (حجمها أكبر من حجم الكرية السليمة) حواف غير منتظمة مشرشرة (امتدادات fimbriation) وتحوي حبيبات شوفنر Schüffner's dots.

الشكل الشطائري schizonte: كروي الشكل يحوي من 4 إلى 16 أقسومة (وسطياً 8 أقاسيم). تأخذ الكريات المصابة شكلاً بيضوياً غير منتظم الحواف (مشرشر)، وتحوي حبيبات شوفنر.

الخلايا العرسية gamete cells: من الصعب تمييزها عن تلك العائدة للمتصورات البيضاوية، حجمها أقل من حجم الكرية الحمراء المصابة نسبياً التي تشاهد فيها حبيبات شوفنر، قد تكون حوافها مشرشرة (امتدادات fimbriation).



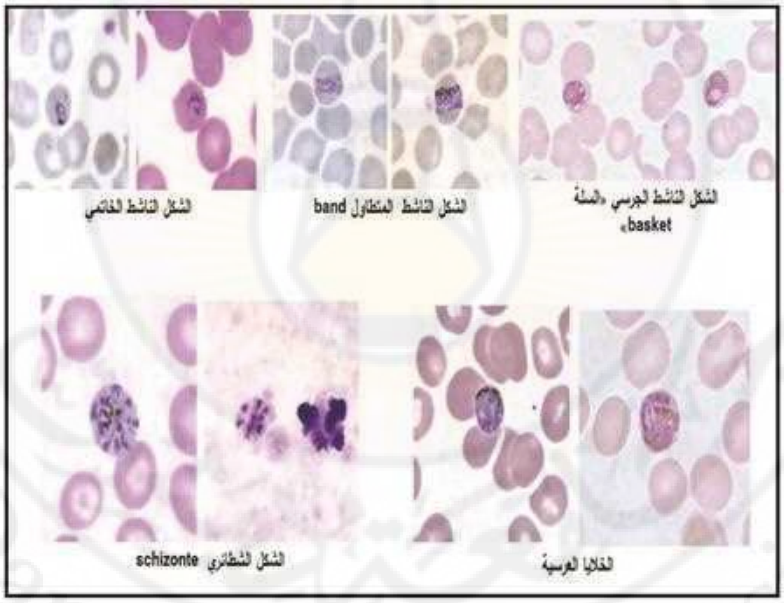
الشكل 37: المراحل التطورية المختلفة لطفيلي المتصورات البيضاوية في لطاخات دم رقيقة ملونة. لاحظ أحياناً تعدد الشكل الخاتمي في الكرية، محيط الكرية المشرشر أو غير المنتظم، حبيبات شوفنر

* المتصورات الوبالية *P. malariae*:

يبيّن الشكل 38 المراحل التطورية المختلفة لهذا الطفيلي:

الشكل الناشط الخاتمي الفتي immature ring form: السيتوبلاسما حلقية كثيفة تحوي بقعة كروماتينية (نواة) واحدة. يمكن أن تظهر أشكال ناشطة تشبه "عين الطائر". لا يلاحظ زيادة في حجم الكرية الحمراء المصابة.

الشكل الناشط الناضج mature ring form: يأخذ إما شكلاً متطاولاً مستعرضاً (band form) أو شكلاً جرسياً (يشبه السلة basket form) داخل الكرية الحمراء، يظهر الكروماتين فيه على شكل كتلة واحدة والبقع الصباغية الملارية تكون كبيرة الحجم ومنتظمة التوضع على المحيط، قد تظهر أحيانا فجوات.



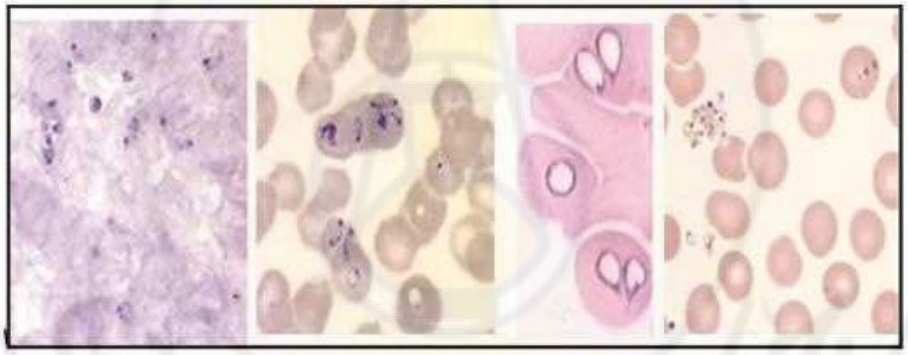
الشكل 38: الأشكال التطورية المختلفة لطفيلي المتصورات الوبالية.

الشكل الشطائري schizonte: يحوي من 6 إلى 12 أقسومة (عادة من 8 إلى 10 اقسومة) منتظمة تشكل ما يُعرف باسم الجسم الوردي. يملأ الشكل الشطائري الناضج تقريباً حيز الكرية الحمراء المصابة كاملاً.

الخلايا العرسية gamete cells: دائرية الشكل، كثيفة وصغيرة الحجم، تملأ كامل حيز الكرية المصابة تقريباً (لا تلاحظ زيادة في حجمها بالمقارنة مع حجم الكرية السليمة)، تنتشر في سيتوبلاسماها التي تتلون بالأزرق بقع صباغية سوداء اللون، وتأخذ النواة (الكروماتين) لون الزهر المائل إلى الاحمرار.

2- جنس البابيزيا *Babesia*

يشبه جنس البابيزيا طفيلي المتصورات المنجلية إلى حد كبير، ومع ذلك فهو يملك بعض الخصائص التمييزية: الطفيليات متعددة الشكل (مختلفة بالشكل والحجم)، والشكل الناشط الخاتمي لا يشكل بقع صباغية ملارية، ويمكن أن يحوي فجوات. يشاهد طفيلي البابيزيا داخل الخلية المضيفة وخارجها ويمكن أن تحوي بعض هذه الأشكال فجوات (الشكل 39).

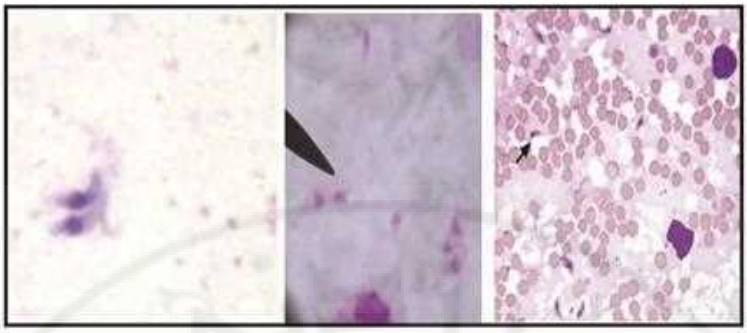


لشكل 39: أشكال لطفيلي البابيزيا في لطاخات دم سميكة ورقيقة ملونة بغيمزا. لاحظ: الأشكال الرباعية، الطفيلي داخل وخارج الخلية، الفجوة داخل بعض الأشكال

3- المقوسة القندية *Toxoplasma gondii*

الأشكال الناشطة السريعة Tachyzoites:

هلالية الشكل، صغيرة الحجم (4-8 × 2-3 µ)، ذات نهاية أمامية ضيقة ونهاية خلفية مستديرة تتوضع بالقرب منها نواة كبيرة الحجم (الشكل 40). يمكن مشاهدة هذه الأشكال منتشرة في عدة أماكن من جسم المصاب (كالدم، والسائل الأمنيوسي Amniotic fluid ، والسائل الرئوي Pulmonary fluid وغيرها).



الشكل 40: الأشكال الناشطة السريعة tachyzoites (السهم) للمقوسة القندية في لطاخات ملونة بغيمزا. لاحظ: النهايتين الأمامية والخلفية، النواة كبيرة الحجم

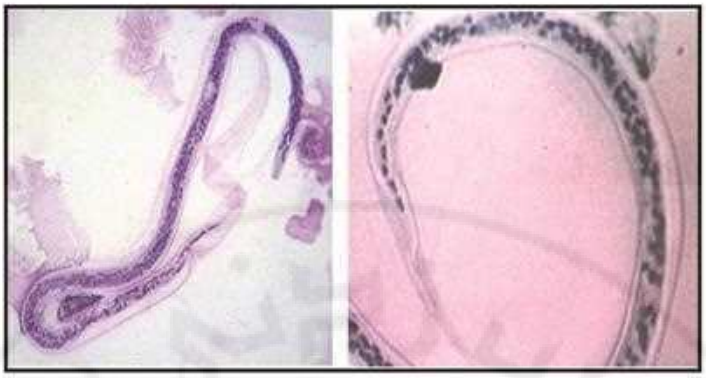
التطبيق العملي

- التعرف على جنس المتصورات من خلال مشاهدة مختلف المراحل التطورية داخل الكريات الحمر، بالإضافة إلى رؤية المراحل التطورية في جهاز هضم البعوض الناقل (بيضة متحركة ookinete، بيضة متكيسة oocyst، كيس بذور sporocysts، عناصر بذيرية sprozoites)، مع رسم جميع هذه المراحل.
- التعرف مع الرسم، على طفيلي البابيزيا من خلال رؤية الأشكال الرباعية والفجوة داخل بعض الأشكال.
- التعرف على طفيلي التوكسوبلاسما من خلال رؤية أشكاله الهلالية ذات نهاية الضيقة وأخرى عريضة فيها نواة كبيرة الحجم نسبياً، مع رسم عدد من هذه العناصر الطفيلية.

ثالثاً: الخيطيات الدقيقة الدموية Blood microfilaria

1- يرقة الفخرية البنكروفتية *Wuchereria bancrofti larva*

خيطيات دقيقة مغمدة، جوالة في الدم (تتلون بغيمزا أو بالهيماتوكسيلين)، تظهر بين الساعة 10 مساء وحتى الساعة الثانية صباحاً، يتراوح طولها تقريباً بين 240 و 300 µ، جسمها منحني قليلاً، يتناقص حجمه باتجاه المنطقة الخلفية (منطقة الذيل) حتى يصبح مؤنفاً، تكون النوى غير مضغوطة كثيراً (يمكن ملاحظتها منفردة) ولا تصل إلى نهاية الذيل. تحاط اليرقات بغمد أطول من جسمها (الشكل 41).



الشكل 41: اليرقة الخيطية المغمدة للفخرية البنكروفتية في لطاخات ملونة بملون غيمزا أو بملون الهيماتوكسيلين. لاحظ: الغمد الطويل، النوى غير المرتصة في النهاية الذيلية

3- يرقة اللوا اللوية *Loa loa larva*

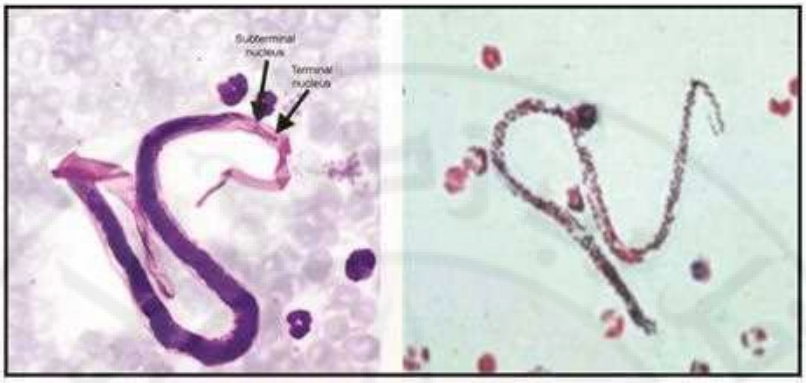
خيطيات دقيقة مغمدة (الغمد أطول من جسم اليرقة بقليل)، جوالة في الدم (تظهر في النهار)، يتراوح طولها بين 240 و 300 µ، يتناقص حجم الجسم باتجاه النهاية الخلفية حيث تصل النوى لنهاية الذيل (الشكل 42).

الشكل 42: يرقة الخيطية اللوية في لطاخات دم سميكة ملونة بغيمزا أو بالهيماتوكسيلين. لاحظ: النوى تصل لنهاية الجسم، الغمد غير الملون

2- يرقة البروجية الملاوية *Brugia malayi larva*

خيطيات دقيقة مغمدة (الغمد أطول من الجسم)، جوالة في الدم تظهر بين الساعة 10 مساء وحتى الساعة الثانية صباحاً، يتراوح طولها تقريباً بين 170 و 230 µ،

جسمها شديد الالتفاف، يتناقص حجمه باتجاه المنطقة الخلفية (منطقة الذيل)، وتملك في هذه النهاية نواتين منفصلتين عن باقي نوى الذيل (الشكل 43).



الشكل 43: اليرقة الخيطية للبروجية الملاوية في لطاخات ملونة بغيمزا أو بالهيماتوكسيلين.
لاحظ: الغمد الطويل، النواتين الذيليتين (السهم)

التطبيق العملي

يُطلب التعرف مع الرسم على:

- شكل يرقة الفخرية من خلال مشاهدة الغمد الطويل وتوضع النوى وتوزعها (عدم وصولها لنهاية جسم اليرقة).
- شكل يرقة اللوا من خلال رؤية الغمد (القريب إلى طول اليرقة) وتوضع النوى وتوزعها (تصل إلى نهاية الجسم).
- شكل يرقة البروجية المزودة بغمد طويل مع وجود نواتين منفردتين في نهاية جسم اليرقة.

الفصل الثالث

تشخيص الأخماج الطفيلية الرئوية والعصبية والبولية-التناسلية

Pulmonary, Neuropath, Genitourinary Parasite Infection Diagnosis

أولاً: الأخماج الطفيلية الرئوية Pulmonary parasite infections

يعتمد تشخيص إصابة الجهاز التنفسي بأحد أنواع الطفيليات الرئوية الطفيلية على العينة المفحوصة (كالقشع والسائل القصبي الرئوي وغيرها) والتي من خلالها يشاهد الطفيلي ويُميز بشكل جيد.

1- الحصول على العينات

آ- القشع sputum:

يفيد الفحص المجهري للقشع في تمييز البيوض (المتورقة الرئوية *P. westermani*) واليرقات (الإسطوانية البرازية *S. stercoralis*، حيات البطن *A. lumbricoides*، الملقوات *Ancylostoma*) وأحياناً المتحولة الزحارية *E. histolytica* والكيسة المائية للمشوكة الحبيبية *E. granulosus*.

تُجمع عينة القشع في الصباح الباكر (قبل تناول أي طعام أو تنظيف الأسنان) وتؤخذ من مجرى التنفس السفلي (حتى لا يكون محتوى العينة فقط مادة لعابية)؛ لتُنقل مباشرة إلى المختبر لمعالجتها من أجل الدراسة والفحص.

يمكن لعينة القشع المائية أن تُفحص مباشرة بعد تحضير عينة رطبة في محلول فيزيولوجي، أو أن تُحفظ وتُكثف في الفورمالين (10%) أو في الفورمالين – أسيتات الإيتيل (يؤخذ الراسب بعد التثفيل لعمل محضرات ملونة بمحلول اليود أو غير ملونة في السائل الفيزيولوجي)، وفي حال الشك بوجود وحيدات خلية، يتم حفظ العينة وتكثيفها في PVA وتلوينها بملون trichrom . وهنا تجدر الإشارة إلى ضرورة أخذ الحذر عند فحص

العينة مجهرياً وعدم الخلط بين المتحولة اللثوية *E. gingivalis* (التي يمكن رؤيتها في القشع باعتبارها موجودة في الفم) والمتحولة الزحارية *E. histolytica* (المسببة للتقرحات الرئوية) من خلال وجود العدلات عديدة النوى (متحولة لثوية) أو اختفائها (متحولة زحارية). تُمزج عينة القشع الكثيفة والمخاطية اللزجة مع حجم مماثل من محل قشع ممدد في الماء المقطر بنسبة 10:1 (dithiothreitol أو NaOH 3%) على جهاز الفورتكس vortex، وتترك لتهدأ 30 دقيقة، ثم تُثقّل ويؤخذ الراسب لتحضير العينة المطلوبة للدراسة.

ب- السائل القصبي الرئوي Bronchial pulmonary fluid:

يساعد فحص السائل الرئوي على كشف الإصابة ببعض أنواع وحيدات الخلية كالمتكيسة الرئوية *Pneumocystis carinii* وأحياناً المقوسة القندية *T. gondii*. فبعد الحصول على العينة يتم تثفيلها وأخذ الراسب مباشرة لتحضير اللطاخة من أجل الدراسة المجهرية. أما إذا كان الراسب كثيفاً حاوياً على مادة مخاطية فيمزج مع محل للقشع بنسبة 1:1، ويترك ليهدأ مدة 30 دقيقة، ثمّ يثفل ويؤخذ الراسب لتحضير اللطاخة المجهرية.

ج- الخزعة الرئوية pulmonary biopsy:

تُثبت الخزعة النسيجية مباشرة في الفورمالين (10%) أو البوان (Bouin's Fixative) لإجراء المقاطع النسيجية (وفقاً للطريقة المذكورة آنفاً في معالجة الخزعات المعوية). إلاّ أنه وفي بعض الحالات التي تحتاج إلى نتيجة تشخيصية أولية سريعة، قبل إجراء الدراسة النسيجية (عند الإصابة بداء المتكيسات الرئوي مثلاً) يجري تطبيق ما يُعرف بالمحضر اللمسي"touch preparation". وفيه تؤخذ قطعة من النسيج الرئوي وتمرر عدة مرات بلطف على سطح صفيحة زجاجية نظيفة وتترك في الهواء لتجف تماماً، ومن ثمّ تثبت بالإيتانول أو بالميتانول (حسب طبيعة الملون المستخدم).

ولتحضير المعلق الرئوي تُسحق قطعة من الخزعة الرئوية (نسيج الرئة) في طبق بتري يحوي 2 مل من محلول فيزيولوجي ، ثم يُنقل المزيج إلى أنبوب ويخلط جيداً على جهاز الفورتكس لمدة 2 دقيقة. توضع قطرة من المعلق على صفيحة زجاجية وتترك لتجف

تماما في الهواء بدرجة حرارة الغرفة، ومن ثم تثبت بالإيتانول أو بالميتانول تبعاً للملون المستخدم.

2- طرائق التلوين

سيتم استعراض طرائق تلوين تفيد في ملاحظة المتكيسة الرئوية *Pneumocystis carinii* فقط، أما بالنسبة للمثقوبات الرئوية ويرقات الإسطوانيات فيمكن مشاهدتها في العينة من غير تلوين.

آ- التلوين بملون:

methenamine-silver stain (Gomori's silver methenamine, "GMS"):

تحضير العينة:

- إذا كانت العينة خالية من المخاط والدم، يتم تثفيلها مباشرة (لمدة 10 دقائق على السرعة 2000 دورة/د) للحصول على الراسب الذي يُستعمل في عمل اللطاخات المجهرية تمهيداً لتلوينها (يُفضل تحضير عينة شاهدة للمقارنة مع العينة المفحوصة).
- إذا كانت العينة تحوي على مواد مخاطية، عندها تُعالج بمادة حالة للمخاط بنسبة حجم: حجم، ثم تثفل على السرعة 2000 دورة/الدقيقة، وبعد إزالة السائل الطافي ، يُمزج الراسب جيداً وتؤخذ منه قطرة تفرش على سطح صفيحة مجهرية وتترك لتجف تماماً في الهواء وبدرجة حرارة الغرفة تمهيداً لتلوينها.
- وعند وجود الدم في الراسب لا بد من معالجته بمحلول حال للدم (مثل saponin) وتثفيله على السرعة 2000 دورة/ الدقيقة، وبعد إزالة السائل الطافي تحضر اللطاخات المجهرية من الراسب.

تحضير الكواشف:

تُحفظ جميع الكواشف في درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية) ما عدا نترات الفضة الذي يُحفظ في الدرجة +4 مئوية.

- محلول methenamine (3%):

12 غ Hexamethylenetetraamine + 400 مل ماء ثنائي التقطير.

- محلول أم methenamine-silver nitrate (MSN): 400 مل methenamine (3%) + 20 مل نترات الفضة (5%). وهو سائل شفاف يوزع على أنابيب ذات غطاء محلزن.

يتألف محلول العمل الذي يحضر عند الاستعمال من: 25 مل محلول أم MSN + 2 مل بورات الصوديوم (5%) + 25 مل ماء ثنائي التقطير.

- محلول ثنائي كبريتات الصوديوم (1%): 1 غ ثنائي كبريتات الصوديوم + 99 مل ماء ثنائي التقطير.

- محلول كلور الذهب (0.2%): 200 ملغ كلور الذهب + 100 مل ماء ثنائي التقطير.

- محلول أم light green (يبقى صالحاً لمدة سنة تقريباً):

200غ light green SF + 0.2 مل حمض خل ثلجي + 100 مل ماء ثنائي التقطير، و يتألف محلول العمل من: 10 مل محلول أم + 40 مل ما ثنائي التقطير.

مراحل التلوين:

تتم طريقة التلوين بالتسخين في حمام مائي، حيث تترسب الشوارد المعدنية الحامضية الساخنة على جدران الخلية (الطفيليات والفطور) لجعلها واضحة في العينة المفحوصة، وهي تشتمل على الخطوات الآتية:

- تسخين الحمام المائي لمدة 45 – 60 دقيقة حتى يصل للدرجة 80 مئوية.
- تثبيت العينة المحضرة بالميتانول لمدة 3 دقائق على الأقل وتركها لتجف في الهواء.
- وضع كل من حمض الكروم ومحلول العمل MSN في حمام مائي لمدة 5 دقائق على الدرجة 80 مئوية.
- وضع الشريحة في حمض الكروم المسخن بالحمام المائي للدرجة 80 مئوية لمدة 2 دقيقة، ومن ثم غسلها في ثلاث حمامات متتالية من الماء المقطر (10 ثواني لكل حمام)
- وضع الشريحة في ثنائي كبريتات الصوديوم (1%) لمدة 30 ثانية، ومن ثم غسلها في ثلاث حمامات متتالية من الماء المقطر (10 ثواني لكل حمام).

- تغطيس الشريحة في محلول MSN و حضنها بالحمام المائي بالدرجة 80 مئوية لمدة 4.5 دقيقة، ومن ثم غسلها ثلاث مرات في الماء المقطر (10 ثواني لكل مرة).
- تغطيس الشريحة في محلول كلور الذهب (0.2%) لمدة 30 ثانية، ومن ثم غسلها بالماء المقطر ثلاث مرات متعاقبة (10 ثواني لكل مرة).
- غمر الشريحة بمحلول ثنائي كبريتات الصوديوم (2%) لمدة 30 ثانية (لإزالة آثار الفضة) ومن ثم غسلها بالماء المقطر ثلاث مرات متتالية (10 ثواني لكل مرة)
- غمر الشريحة بملون light green مدة 30 ثانية، ومن ثم الغسل بالماء المقطر (ثلاث مرات بمعدل 10 ثواني للمرة الواحدة).
- تغطيس الشريحة في حمامين من الإيتانول 90% (مدة 30 ثانية للمرة الواحدة) ثم الإيتانول 100% (أيضاً لمدة 30 ثانية للمرة الواحدة) وأخيراً في حمامين من الكزيلول (30 ثانية / الحمام) تمهيداً لوضع بلسم كندا وتغطية العينة بالسائرة الزجاجية وتركها لتجف على سخان الشرائح بالدرجة 60 مئوية.

في حال عدم توافر حمام مائي، يُستعمل المايكرويف لمدة 70 ثانية عند وضع الشريحة في حمض الكروم، وكذلك عند وضعها في الملون MSN، وتستكمل باقي الخطوات السابقة. تأخذ جدران أكياس طفيلي *Pneumocystis* اللون الرمادي أو البني الداكن.

ويعود الحصول على نتائج غير مقبولة إلى أحد الأسباب الآتية:

- وجود راسب من الفضة على الصفيحة.
- قِدم المحاليل: حمض الكروم، ثنائي كبريتات الصوديوم، MSN، ثلاثي كبريتات الصوديوم.
- عدم استعمال الماء ثنائي التقطير في تحضير المحاليل وفي عمليات الغسيل المتكررة.
- الحصول على عينة عاتمة بسبب عدم كفاية الفترة الزمنية اللازمة لنزع الماء من العينة وتفتيحها عند وضعها في الكزيلول (لا بد من إعادة خطوة حمامات الإيتانول متزايدة التركيز والكزيلول).

ب- التلوين بملون غيمزا Geimsa stain:

تُستعمل جميع الكواشف المذكورة آنفا وتطبق كافة مراحل التلوين المتبعة للكشف عن الطفيليات الدموية في لطاخات الدم الرقيقة والسميكة.

ج- التلوين المعدَّل بأزرق التولويدين:

تُطبق هذه الطريقة على لطاخات مجهرية محضرة من عينات نسيجية أو قشع أو سائل قصبي رئوي ومجففة بالهواء، حيث تستطيع جدران بعض أنواع الطفيليات والفطور امتصاص ملون التولويدين الأزرق toluidine blue بعد معالجتها بالكاشف الكبريتي.

تحضير الكواشف:

- المحلول I (sulfation reagent): 45 مل حمض خل ثلجي + 15 مل حمض كبريت كثيف.

توضع كمية حمض الخل الثلجي في زجاجة موجودة في حمام بارد (+8 درجة مئوية)، و يضاف إليها ببطء كمية حمض الكبريت الكثيف ويمزجان جيداً. تغلق الزجاجة جيداً وتترك في درجة حرارة الغرفة ويكون المحلول صالحاً للاستعمال مدة أسبوع.

- محلول ملون التولويدين: 300 ملغ أزرق التولويدين + 60 مل ماء مقطر + 2 مل حمض كلور الماء الكثيف + 140 مل إيتانول مطلق.

تُحل كمية الملون في الماء المقطر جيداً، ثم يضاف إلى المحلول (على الترتيب) كمية حمض كلور الماء وكمية الإيتانول المطلق. يحفظ المحلول الناتج في درجة حرارة الغرفة ويبقى صالحاً للاستعمال لمدة شهر أو أكثر.

خطوات العمل:

- تحضير اللطاخة المجهرية (كما ورد أعلاه) وتجفيفها تماما بالهواء.
- تثبيت العينة بالإيتانول المطلق لمدة دقيقة وتركها لتجف في الهواء.

- وضع الشريحة في المحلول I (الكاشف الكبريتي) لمدة 10 دقائق (شريطة أن يتم تحريك الكاشف بقضيب زجاجي عند وضع الشريحة مباشرة وبعد مضي 5 دقائق) ومن ثم غسلها لمدة 5 دقائق بماء بارد.
- نقل الشريحة إلى حوض يحوي المحلول الملون وتركها فيه لمدة 3 دقائق.
- تمرير الشريحة الزجاجية عدة مرات في الإيتانول 90% لمدة 10 ثواني، ومن ثم في الإيتانول المطلق 100% لمدة 10 ثواني أيضاً، وأخيرا في الكزيلول تمهيداً لوضع قطرة من بلسم كندا وتغطيتها بالسائرة وتركها لتجف على سخان شرائح بالدرجة 60 مئوية.

دراسة بعض الأنواع الطفيلية

أولاً: وحيدات خلية Protozoa

1- المتكيسة الرئوية *Pneumocystis carinii* (jirovecii)

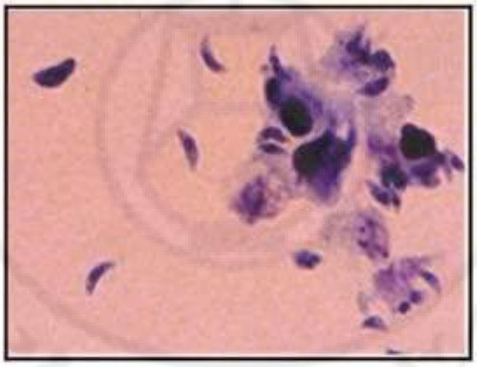
الأشكال الناشطة trophozoites: يتراوح حجمها بين 1 و 5 µ متعددة الشكل وتحوي على نواة واحدة. تشاهد هذه الأشكال أحياناً في عينات خارج رئوية خاصة عند الأشخاص المصابين بالعوز المناعي (الشكل 44).

الشكل 44: المتكيسة الرئوية في عينات من السائل القصبي الرئوي ملونة بملون غيمزا وبملون Gomori

الأشكال المتكيسة cysts: دائرية الشكل (حجمها من 5 إلى 8 µ)، تحاط بجدار سميك، تحوي بداخلها أكثر من 8 أجسام داخل كيسية. تشاهد هذه الأكياس أحياناً في عينات غير رئوية عند المصابين بالعوز المناعي. أما بالنسبة لمرحلة ما قبل الكيس فتأخذ الأكياس شكلاً كروياً (حجمها من 4 إلى 7 µ)، تحوي نواة أو أكثر، وتكون خالية من الأجسام داخل كيسية (الشكل 44).

2- المقوسة القندية *Toxoplasma gondii*

يمكن مشاهدة الأشكال الناشطة السريعة (tachyzoites) لهذا الطفيلي خاصة في عينات السائل الرئوي المأخوذة من مصابين بنقص المناعة المكتسب. وتتميز بشكلها الهلالي وباحتوائها على نواة كبيرة متوضعة بالقرب من المركز (الشكل 45). توجد هذه العناصر حرة في السائل إضافة إلى وجود البعض الآخر المرتبط مع الخلايا الرئوية.

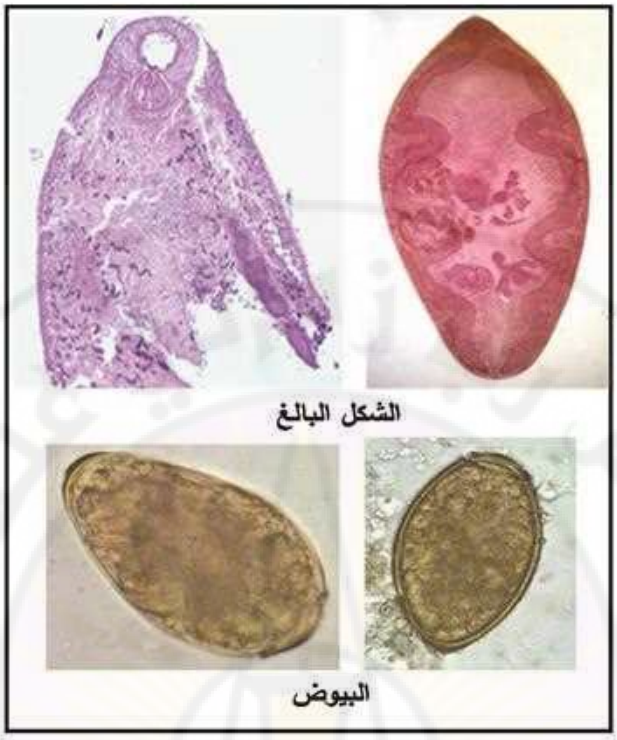


الشكل 45: الأشكال الناشطة السريعة للمقوسة القندية في عينة رئوية ملونة بملون غيمزا.

ثانياً: الديدان

1- المتورقة الرئوية *Paragonimus westermani*

الدودة البالغة adult: خنثى، كبيرة الحجم، بيضوية الشكل، ثنائية المحاجم، بداخلها رحم ومبيض متفرع في القسم الأمامي إلى فرعين (الشكل 46).



الشكل 46: المتورقة الرئوية: الشكل البالغ الملون بصباغ كارمن مع مقطع للدودة في عينة مأخوذة من خزعة رئوية ملونة بالهيماتوكسيلين – إيوزين، والبيوض الغطائية في عينة قشع

البيوض eggs: بيضوية أو متطاولة الشكل، غير متناظرة غالباً، كبيرة الحجم (80–120 µ× 45– 70 µ)، لونها بني مصفر، تُحاط بقشرة سميكة، غطائية (الشكل 46)، وغير جنينية عند خروجها مع القشع (في حالات نادرة يمكن لهذه البيوض أن تسقط في أنبوب الهضم وتطرح مع البراز).

2– اليرقة الخيطية المعدية للإسطوانيات ***Strongyloides*** **larva**

طولها أكثر من 600 µ، الذيل مؤنف (الشكل 47)، نسبة المري إلى المعي متساوية، دخولها إلى المضيف عن طريق الجلد، و تُشاهد في العينات الرئوية المفحوصة خلال حالات حدوث الإصابة الذاتية.

الشكل 47: اليرقة المعدية للإسطوانيات البرازية في عينة قشع ملونة بملون غيمزا. لاحظ الذيل المؤنف

التطبيق العملي

- التعرف على المتكيسة الرئوية بشكليها الناشط والمتكيس مع الرسم.
- مشاهدة الأشكال الناشطة السريعة للمقوسة القندية ذات الشكل الهلالي، ورسمها.
- التعرف على الشكل البالغ للمتورقة الرئوية وبيوضها الغطائية مع الرسم.
- التعرف على يرقة الإسطوانية البرازية مع الرسم.

ثانياً: الأخماج الطفيلية العصبية Neuropath parasite infections

يصيب الجهاز العصبي المركزي بعض أنواع الطفيليات (كالمتحولات الحرة: *Naegleria*, *Acanthamoeba* والتوكسوبلاسما *Toxoplasma* والمثقبيات *Trypanosomes* وأحياناً بعض أنواع يرقات الديدان) التي يتم الكشف عنها في السائل الدماغي الشوكي Cerebrospinal fluid أو في الخزعات الدماغية Cerebral biopsies.

1- تحضير العينات غير الملونة

تؤخذ عينة من السائل الدماغي الشوكي (من 5 إلى 15 مل) وتثفل بالسرعة 2000 دورة / د لمدة 5 دقائق (أو أكثر عند الشك بوجود وحيدات خلية) للحصول على الراسب الذي توضع قطرة منه على شريحة زجاجية تفحص مباشرة تحت المجهر لرؤية حركية الطفيليات (خاصة بالنسبة للمثقبيات التي لا تستطيع البقاء حية أكثر من 20 دقيقة بعد الحصول على العينة). وعند عدم التمكن من إجراء الفحص السريع تُثبت العينة بـ PVA أو تحضر لطاخات دائمة من أجل التثبيت والتلوين، إما بملون غيمزا (المستعمل في تلوين العينة الرئوية والدموية) لتلوين المثقبيات أو بملون trichrome (المستعمل في تلوين العينة البرازية) لتلوين المتحولات الحرة.

2- الاستنبات على وسط صنعي *In Vitro*

يمكن استنبات المتحولات الحرة على آغار غير مغذي فوق طبقة من الجراثيم التي تؤمن المتطلبات الغذائية لوحيدات الخلية المستنبة.

آ- الاستنبات على وسط صلب (bactoagar 2%):

تحضير الوسط

- تحضير وسط page الملحي: حل الكمية المطلوبة من كل مادة من المواد الآتية: NaCl (1.2غ)، MgSO4 7H2O (0.04 غ)، CaCl2 2H2O (0.04 غ)، Na2 HPO4 (1.42 غ)، KH2PO4 (1.36 غ) في 100 ماء مقطر، ثم يؤخذ 10 مل من كل محلول ويستكمل الحجم بالماء المقطر إلى 1000 مل ثم يعقم بالدرجة 121 مئوية لمدة 15 دقيقة.

- تحضير وسط الاستنبات: حل (2 غ) من الآغار في (100 مل) من وسط page الملحي بالتسخين البطيء مع التحريك، ومن ثمّ يتم تعقيم الوسط (بالموصد على الدرجة 121 مئوية لمدة 15 دقيقة) وصبه في أطباق بتري معقمة. يُحفظ الوسط في الدرجة +4 مئوية ويبقى صالحاً للاستعمال مدة سنة تقريباً.

طريقة الاستنبات:

- إضافة 0.5 مل من وسط page الملحي إلى مستنبت يحوي إما جراثيم الكلبسيلا *Klebsiella pneumoniae* أو جراثيم الإيشريكية القولونية *Escherichia coli* لعمل معلق كثيف.

- أخذ من 2 إلى 3 قطرات من المعلق الكثيف بأداة عزل عقيمة وفرشها على سطح وسط الاستنبات.

- وضع قطرة أو قطرتين من راسب السائل الدماغي الشوكي في مركز وسط الاستنبات.

- حضن أطباق الاستنبات بعد إغلاقها جيداً لمنع الجفاف، بالدرجة من 25 إلى 30 مئوية لمدة 7 أيام.

- فحص المستنبت يومياً لمشاهدة الكائنات المتحركة (تظهر الأشكال الناشطة بعد 48 ساعة، والأكياس بعد 4 أو 5 أيام)، عندها تؤخذ كمية من هذه الكائنات بأداة عزل عقيمة وتمزج مع كمية من وسط page الملحي (يمكن استعمال الماء المقطر العقيم)، ثم يضاف إلى العينة 3 حجوم من PVA وتحضر منها اللطاخات الرقيقة التي تلون بملون trichrome (إتباع نفس خطوات تحضير وتلوين العينة البرازية).

ب- الاستنبات على وسط سائل:

تحضير الوسط (خلاصة الخميرة – الغلوكوز – الكازئين – مصل بقري):

المواد المطلوبة: Na2HPO4 (1.15 غ)، كازئيين (1 غ)، KH2PO4 (0.8 غ)، غلوكوز (2.5 غ)، خلاصة خميرة (5غ)، ماء ثنائي التقطير (900 مل).

يسخن 750 مل من الماء ثنائي التقطير ثم يضاف NaCl و الكازئيين بطء، مع استمرار التسخين والتحريك، حتى يصبح المحلول رغوياً، عندها يضاف (من دون تسخين) KH2PO4 ثم الغلوكوز وخلاصة الخميرة وكمية 150 مل ماء ثنائي التقطير. يوزع الوسط على أنابيب محلزنة تمهيداً لتعقيمها بالدرجة 121 مئوية ولمدة 15 ساعة. أخيراً يضاف لكل أنبوب قبل الاستخدام مباشرة 0.5 مل من مصل البقر الجنيني (FCS).

طريقة الاستنبات: وضع قطرتين من راسب السائل الدماغي الشوكي في أنابيب وسط الاستنبات، التي تُحضن بعد إغلاقها جيداً لمنع الجفاف، بالدرجة من 25 إلى 30 مئوية لمدة 7 أيام حيث يتم فحص المستنبت وتحضير اللطاخات كما ورد فيما سبق.

3- الخزعات النسيجية Histological biopsies

تثبت الخزعات النسيجية histological biopsies المأخوذة من أماكن الإصابة عند المضيف (الدماغ، الجلد، كشاطات من القرنية) مباشرة في الفورمالين (10%) أو البوان لإجراء المقاطع النسيجية (وفقاً للطريقة المذكورة آنفاً في معالجة الخزعات المعوية) لمشاهدة المتحولات الحرة وغيرها من الطفيليات. إلاّ أنه وفي بعض الحالات يجري إما تطبيق ما يُعرف بالمحضر اللمسي "touch preparation" (وفيه تؤخذ قطعة من نسيج الدماغ وتمرر عدة مرات بلطف على سطح صفيحة زجاجية نظيفة وتترك في الهواء لتجف تماماً، ومن ثمّ تثبت بالإيتانول أو بالميتانول حسب طبيعة الملون المستخدم)، أو فحص خزعة الدماغ تحت مجهر التشريح للكشف عن الكيسات المذنبة cysticercosis قبل عمل المقاطع النسيجية.

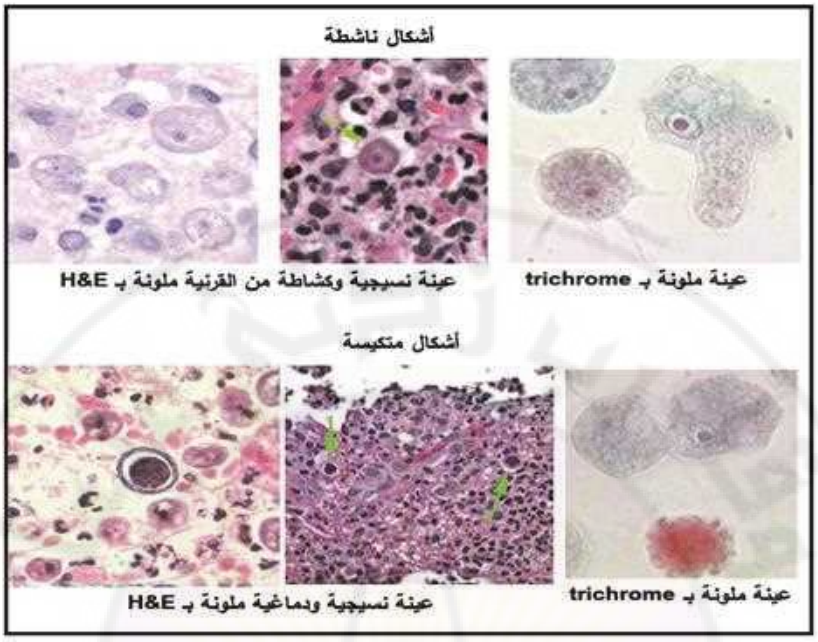
دراسة بعض الأنواع الطفيلية

أولاً: وحيدات الخلية Protozoa

1- المتحولة الحرة *Acanthamoeba sp.*

يتم تشخيص هذه المتحولة برؤية الأشكال الناشطة والأكياس في عينات رطبة أو خزعات نسيجية (الدماغ، القرنية، الجلد) أو كشاطات قرنية بعد تلوينها.

الأشكال الناشطة trophozoites: غير منتظمة الشكل، يتراوح حجمها بين 15 و 45 µ، مزودة بأرجل كاذبة لها شكل الأشواك تُعرف باسم acanthapodia، تحوي نواة كبيرة خالية من الكروماتين وبداخلها نوية مركزية (الشكل 48).

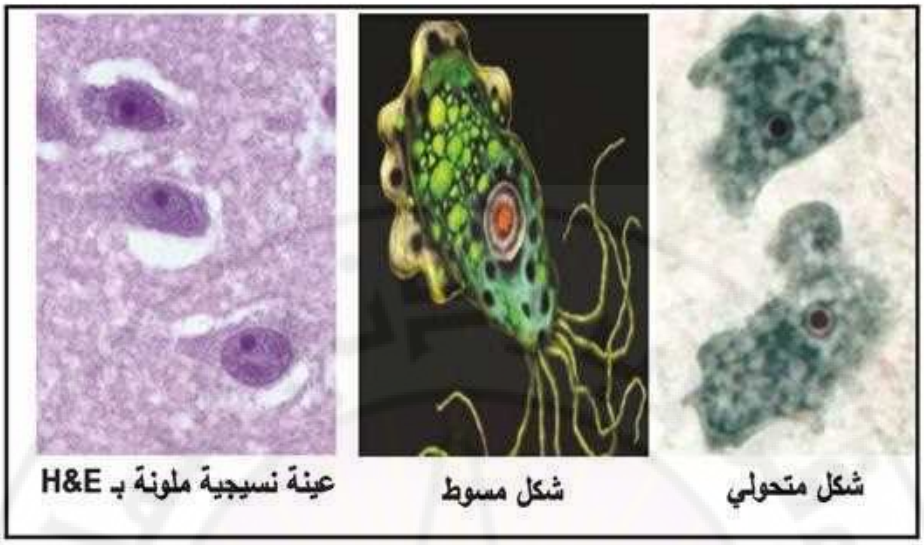


الشكل 48: المتحولة الحرة *Acanthamoeba sp.* لاحظ: الأرجل الكاذبة شوكية الشكل، السيتوبلاسما الحبيبية، النواة وبداخلها النوية مركزي في الشكل الناشط، والمحيط غير المنتظم للشكل المتكيس الملون بالأحمر أو البني الغامق (أسهم).

الأشكال المتكيسة cysts: يتراوح قطرها بين 15 و 20 µ، تكون محاطة بجدار مضاعف سميك: خارجي ليفي مجعد أو دائري وداخلي (يأخذ الشكل السداسي أو الدائري أو النجمي)، يحوي نواة واحدة بداخلها نوية كبيرة الحجم. توجد الأكياس في الدماغ، العين، الجلد، وأحيانا الرئتين وأعضاء أخرى (الشكل 48).

2- المتحولة الحرة النيجلاريا *Naegleria fowleri*

يتم تشخيص هذه المتحولة (التي لا تشكل أكياساً في نسج المضيف) عن طريق فحص عينة رطبة (غير ملونة) للسائل الدماغي الشوكي لملاحظة حركية الأشكال الناشطة السريعة بفضل الأرجل الكاذبة، وعينة ملونة بغيمزا لملاحظة الشكل المورفولوجي للمتحولة. ولهذه المتحولة (عند الإنسان) شكلان ناشطان: المتحولي، والمتحولي السوطي (الشكل 49).



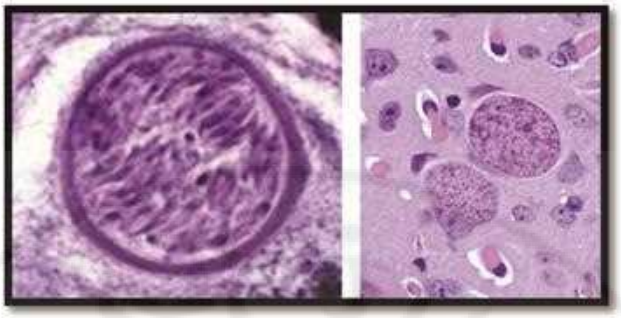
الشكل 49: الشكل الناشط للنيجلاريا في: عينة سائل دماغي شوكي، وسط الاستنبات، عينة نسيجية من الدماغ. لاحظ: النواة وبداخلها نوية كبيرة الحجم، الأرجل الكاذبة (متحولي) أو السياط (مسوط)

يتراوح حجم الشكل المتحولي بين 10 و 35 µ وعندما يستدير يتراوح قطره بين 10 و 15 µ. إما في وسط الاستنبات فيصل حجم الشكل الناشط إلى أكثر من 40 µ، ويحوي على سيتوبلاسما حبيبية فيها فجوات، ونواة وحيدة خالية من الكروماتين وبداخلها نوية مركزية.

3- المقوسة القندية *Toxaplasma gondii*

وحيد خلية بذيري دموي، له عدة مراحل تطورية: الأشكال الناشطة السريعة tachyzoites (سوائل البدن والخلايا الظهارية وكريات الدم البيض)، والكيسات الكاذبة pseudocysts (الجملة العصبية المركزية، العضلات، العين)، البيوض الكيسية oocysts الناضجة المسببة للعدوى.

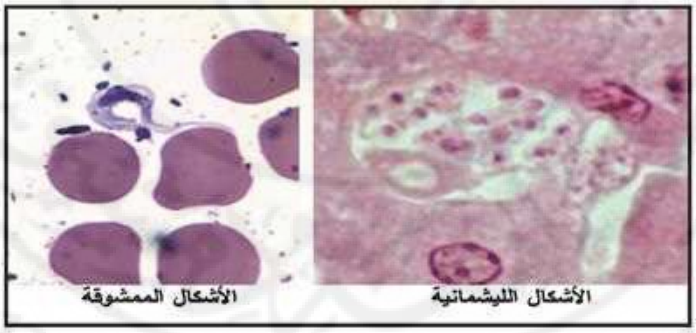
الأكياس الكاذبة الدماغية: كروية الشكل، يتراوح قطرها بين 5 و 50 µ، محاطة بغلاف سميك وتحوي على الأشكال الناشطة البطيئة bradyzoites (الشكل 50).



الشكل 50: أكياس كاذبة للمقوسة القندية في مقاطع نسيجية لعينة دماغية ملونة بـ H&E.

4- المثقبيات البروسية *Trypanosoma brucei*

يُعرف لهذه الطفيليات السوطية الدموية نوعان: المثقبي البروسي *T. brucei* المسؤول عن الداء الإفريقي trypanosomiasis African و المثقبي الكروزي *T. cruzi* المسؤول عن الداء الأمريكي American trypanosomiasis. ويكون لها عدة أشكال تطورية (الشكل 51).



الشكل 51: الأشكال الليشمانية للمثقبي الكروزي في مقطع نسيجي لعينة دماغية ملونة بـ H&E، والأشكال المشوقة للمثقبي البروسي في عينة بزل سائل دماغي شوكي ملونة بغيمزا.

تُصيب هذا الطفيليات الجهاز العصبي المركزي في المراحل المتأخرة من الخمج وتشاهد في خزعات نسيجية وفي السائل الدماغي الشوكي إلى جانب الخلايا اللمفية والوحيدة.

التطبيق العملي

- مشاهدة أشكال المتحولات الحرة *Acanthamoeba* والنيجلاريا *Naegleria* مع رسمها.

- مشاهدة الأكياس الكاذبة لطفيلي التوكسوبلاسما وبداخلها الأشكال الناشطة البطيئة، مع الرسم.

- مشاهدة الأشكال الليشمانية للمثقبي الكروزي مع الرسم.

ثالثاً: الأخماج الطفيلية البولية التناسلية Genitourinary parasite infections

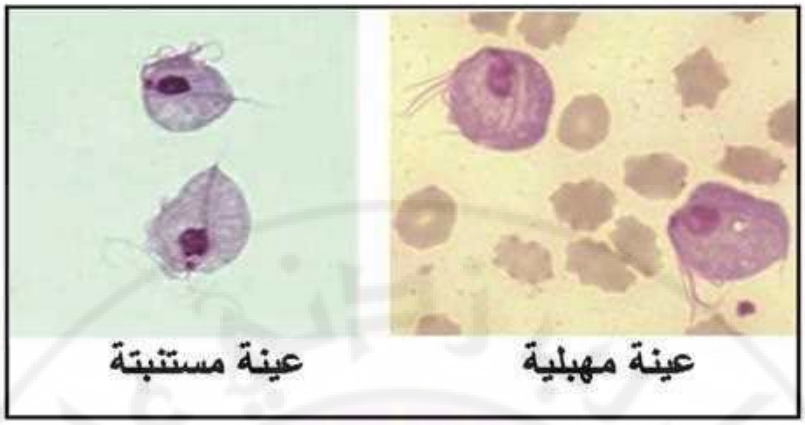
يمكن أن يصيب الجهاز البولي التناسلي بعض أنواع الطفيليات كالمشعّرة المهبلية *Trichomonas vaginalis* (المسببة للالتهابات المهبلية غير النوعية nonspecific urethritis) و بيوض المنشقة الدموية وبشكل عرضي بيوض الحرقص أو اليرقات الخيطية للإسطوانيات.

دراسة بعض الأنواع الطفيلية

أولاً: وحيدات الخلية Protozoa

1- المشعّرة المهبلية *Trichomonas vaginalis*

يجب أن يتم الفحص المجهري بسرعة لمشاهدة الأشكال الناشطة المتحركة للمشعرة المهبلية، إما في راسب العينة البولية الذي يمزج مع قطرة من محلول ملحي على شريحة زجاجية (تؤخذ العينة في الصباح الباكر وتُنقّل لمدة 5 دقائق على سرعة 3000 دورة/د) أو في عينة رطبة (مفرزات المهبل والرحم أو مفرزات البروستات والاحليل) ممددة في قطرة من محلول ملحي على الصفيحة، وعند عدم التمكن من إجراء الفحص مباشرة، يتم حفظ العينة في محلول PVA وتحضر شرائح للتلوين (ملون غيمزا) من أجل الدراسة لاحقاً. على الرغم من الحصول على نتيجة تشخيصية سريعة تفيد في المعالجة الفورية، إلاّ أن طريقة الفحص المجهري تكون غير حساسة نسبياً بالمقارنة مع طريقة استنبات الطفيلي (تحتاج من 3 إلى 7 أيام للحصول على النتيجة).



الشكل 52: أشكال ناشطة للمشعرة المهبلية ملونة. لاحظ: النواة الكبيرة في النهاية الأمامية، السياط، الغشاء المتموج

الأشكال الناشطة trophozoites: بيضوية الشكل (دائرية أحياناً)، يتراوح حجمها بين 8 و 30 µ، مزودة بخمسة سياط (4 سياط أمامية وواحد خلفي يشكل مع جدار الجسم غشاء متموج)، تحوي سيتوبلاسماها عدد من الحبيبات ونواة كبيرة الحجم أمامية التوضع (الشكل 52) بداخلها نوية صغيرة وحبيبات كروماتينية.

ثانياً: الديدان Helminthes

1- المنشقة الدموية *Schistosoma haematobium*

يجري التشخيص النهائي للإصابة بالمنشقة الدموية عن طريق الفحص المجهري لراسب عينة بولية (إما أن تُترك لتهدأ مدة 15 إلى 20 دقيقة أو أن تُثقل بسرعة 2000 دورة /د لمدة 5 دقائق) من أجل مشاهدة بيوض هذه الديدان (الشكل 53). يصل عدد البيوض التي تُطرح مع البول إلى الذروة عند منتصف النهار تقريباً (لذلك يُفضل جمع عينة البول ما بين الساعة 12 والثالثة ظهراً)، إذا احتوت عينة البول كمية كبيرة من كريات الدم عندها يجب حل الكريات عن طريق مزجها مع حجم مماثل من الماء المقطر أو من مادة الـ saponin ومن ثمّ تثفيلها للحصول على الراسب للفحص والدراسة.

الشكل 53: بيوض المنشقة الدموية. لاحظ: الشوكة الانتهائية، والجنين المهدب المتحرك في البيوض الحية

يمكن اللجوء إلى عد بيوض هذه الديدان بعد تمرير حجم ثابت من العينة البولية على مراشح خاصة (Millipore filter). إذا كانت نتيجة الفحص المجهري للعينة سالبة، عندها يتم أخذ خزعات نسيجية من المثانة (تُثبت وتعالج وفقاً للطريقة المذكورة بالنسبة للخزعات المعوية) لمشاهدة البيوض (الشكل 53).

البيوض: كبيرة الحجم (115–180 × 40–70 µ)، مزودة بشوكة انتهائية، بداخلها جنين مهدب مكتمل النمو عند خروجها مع البول (الشكل 53).

التطبيق العملي

- مشاهدة الأشكال الناشطة للمشعرة المهبلية ورؤية النواة الكبيرة، والسياط، والغشاء المتموج
- مشاهدة بيوض المنشقة الدموية مع تمييز الشوكة انتهائية التوضع.

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الباب الثاني

الأخماج الجرثومية

Bacterial infections

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الأول

الحصول على العينات المرضية واستنباتها

يُعد تمييز وتحديد العامل المسبب للخمج ضروري جداً من أجل تطبيق المعالجة الصحيحة بالأدوية المناسبة. تكون المعالجة الأولية تجريبية اعتماداً على معرفة وبائية الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأخماج من جهة، وعلى الأعراض السريرية التي تظهر لدى المصاب من جهة أخرى.

يشتمل التشخيص المخبري للأحياء الدقيقة الممرضة على عدد من التقانات المخبرية التي تساعد الطبيب في تحديد نوع الكائن الحي الممرض، ومنها: الفحص المجهري المباشر، استنبات الكائنات الحية الدقيقة من أجل تحديد نوعيتها، الكشف عن المستضدات الجرثومية، الكشف عن DNA أو RNA الكائن الحي الدقيق، الكشف عن التفاعل الالتهابي والاستجابة المناعية ضد الكائنات الحية الدقيقة، مع الإشارة إلى اعتماد هذه التقانات على القصة المرضية والفحص السريري للمصاب.

أولاً: الحصول على العينات المرضية:

نظراً لأن الكائنات الحية الدقيقة تتخرب بسرعة في الوسط الخارجي، لا بد من نقلها مباشرة بعد العزل إلى المختبر لإجراء الفحص والدراسة عليها.

1- القشع Sputum:

تُجمع عينات القشع في أوعية نظيفة وجافة وعقيمة ومزودة بفتحة واسعة. يُفضل جمع عينة القشع صباحاً بعد الاستيقاظ مباشرة وقبل غسيل الفم، كما ينصح بأخذ ثلاث عينات صباحية متتالية عند الشك بوجود إصابة بالسل الرئوي (الناتج عن *Mycobacterium tuberculosis*).

2- عينات الحلق throat specimens:

يتم الحصول على عينة من الحلق (مسحة من الحلق) باستعمال أداة عزل عقيمة "sterile swab" مع أخذ الحيطة والحذر من حدوث تلوث الأداة باللعاب، بعدها توضع

الأداة مباشرة في وعائها العقيم (أنبوب غالباً) لترسل سريعاً إلى المختبر للفحص مباشرة أو تحفظ بالدرجة +4 مئوية لحين الدراسة والفحص.

3- العينات الأنفية البلعومية nasopharyngeal specimens:

يتم الحصول على المفرزات الأنفية البلعومية باستعمال أداة عزل معقوفة عقيمة "nasopharyngeal swab" تُدخل عبر الفتحة الأنفية للمصاب بعد تثبيت رأسه نحو الأعلى، وباتجاه الخلف ومن ثمّ يتم تدوير الأداة في تلك المنطقة لتسحب فيما بعد وتوضع في وسط خاص تمهيداً لنقلها إلى المختبر.

4- عينات القيح pus specimens:

تُجمع عينات القيح عادة باستعمال أداة عزل عقيمة خاصة، أو محقن يتم بواسطته سحب القيح ووضعه في وعاء عقيم مزود بغطاء محلزن أو في أنبوب معقم.

5- عينات البراز stool specimens:

يُفضل جمع العينات البرازية أثناء حدوث الإسهال الحاد، حيث تجمع العينة في أوعية نظيفة وجافة وعقيمة وذات غطاء محلزن. يمكن الاكتفاء أحياناً بأخذ مسحة شرجية بواسطة أداة عزل عقيمة "rectal swab".

6- عينات البول urine specimens:

تُجمع العينة البولية (القسم الأوسط من البول) بعد تنظيف المنطقة التناسلية البولية بالماء جيداً في وعاء جاف عقيم وعريض مزود بغطاء محلزن لترسل مباشرة إلى المختبر للتحليل أو تحفظ بالدرجة +4 مئوية لحين الدراسة.

ينصح بأخذ ثلاث عينات من البول متتالية أو يجمع بول 24 ساعة كاملة، عند الشك بوجود إصابة بالسل الكلوي renal tuberculosis.

يجري في البداية فحص عينة البول بالعين المجردة من خلال وصف مظهرها الخارجي (شفاف أو عكر) ومن ثم تفحص مجهرياً بعد تثفيلها لمشاهدة الجراثيم والكريات الحمراء، الخلايا القيحية...الخ. وعند وجود مؤشر عن أي حالة مرضية تُؤخذ عينة لاستنباتها على الوسط الصنعي المناسب.

7- عينات الدم blood specimens:

تُؤخذ عينات الدم عندما ترتفع حرارة المريض وقبل البدء بالمعالجة، ويتم الحصول على عينة الدم من أجل الاستنبات بشكل عقيم حيث تؤخذ من المصاب عند الشك بوجود إنتان أو تجرثم دموي. ويُسحب الدم الوريدي عادة من الأوردة الموجودة في الذراع أو المرفق بواسطة محقن جاف. ويفضل أن يكون الذراع دافئاً والشخص في وضعية مريحة ويطبق الرباط المطاطي tourniquet حول العضد برفق ويكون ما بين الكتف والمرفق، ومن ثم ينظف الجلد في المكان المراد وخزه (مكان الوريد المناسب) بقطنه مبللة بكحول طبي ويترك ليجف قليلاً، بعد ذلك يفرغ المحقن من الهواء بسحب المدك ودفعه مرارا بحيث يطرد كل الهواء الموجود داخل المحقن، ومن ثم تدخل إبرة المحقن العقيمة في الوريد بوخزة واحدة على أن تكون نهاية الإبرة المشطوفة إلى الأعلى، وعند بدء خروج الدم يزال الرباط المطاطي ويسحب من 5 – 10 مل من الدم. تحرر إبرة المحقن بلطف بعد الضغط على مكان الوخز بقطعة من القطن المبلل بالكحول.

7- عينات السائل الدماغي الشوكي cerebrospinal fluid:

تُجمع عينة السائل الشوكي بإجراء بزل قطني "lumbar puncture" باستعمال محقن بزل عقيم وخاص، فبعد تنظيف مكان أخذ العينة بالبوفيدون الكحولي 10% وفقاً للخطوات المذكورة آنفاً عند جمع عينة الدم، تُدخل إبرة المحقن في الفراغ بين الفقرتين القطنيتين الرابعة والخامسة ويجمع السائل الدماغي الشوكي في وعاء جاف عقيم. تستنبت العينة مباشرة (لأن أي تأخير في عملية الاستنبات يؤدي إلى موت العناصر الممرضة الحساسة مثل *Meningococci* و *Pneumococci*) وتحفظ العينة بشروط مناسبة للجرثوم المطلوب التحري عنه.

في البداية يجري وصف العينة بالعين المجردة: شفافة أو عكرة، تحوي دم أو قيح، ومن ثم يتم عد الكريات البيض (ارتفاع عدد العدلات عند الإصابة بالتهاب السحايا meningitis). وبعد ذلك يجري تثفيل العينة ويؤخذ السائل الطافي من جهة للكشف عن المستضدات الجرثومية بتطبيق اختبارات التراص باستعمال حبيبات اللاتكس، ومن جهة أخرى لتطبيق بعض التفاعلات الكيميائية (كمعايرة انخفاض الغلوكوز وارتفاع البروتين في

الإصابات الجرثومية. أما في التهاب السحايا الفيروسي فيكون تركيز الغلوكوز طبيعياً والبروتين طبيعياً أيضاً، قد يشاهد في بعض الأحيان ارتفاع طفيف في نسبتهما)، في حين يؤخذ الراسب ويستنبت على وسط صنعي مناسب، على أن يتم تحضير العينة في جو عقيم.

ثانياً: أوساط الاستنبات:

تؤمن أوساط الاستنبات الحية (*in vivo*) والصنعية (*in vitro*) جميع المتطلبات الغذائية الأساسية اللازمة لنمو الكائنات الحية الدقيقة وتكاثرها، حيث تتفاوت هذه المتطلبات والاحتياجات بين الأنواع المختلفة لهذه الكائنات. فالأوساط الحية (بيض الدجاج – خصية الارنب ..الخ) تُستعمل في استنبات الفيروسات، في حين تُستعمل الأوساط الصنعية (بسيطة simple – غنية enriched – انتقائية selective أو تفريقية differential وغيرها) لتأمين نمو الكائن الحي الممرض المطلوب وتثبط نمو بقية الكائنات.

1- الأوساط البسيطة simple media:

تُستعمل هذه الأوساط لتأمين الحفاظ على الكائنات الحية ونموها ريثما يتم نقلها إلى الأوساط الغنية والانتقائية. من الأوساط البسيطة:

الأوساط السائلة: كمرق اللحم المضاف إليه الببتون وكلور الصوديوم الذي يستعمل في استنبات الدم، وعند إجراء اختبار التخثر coagulase test (للجراثيم العنقودية *Staphylococcus*)، وكقاعدة لتحضير الآغار المغذي أو الجيلاتين. أما الببتون المائي أو الفيزيولوجي المضاف إليه كلور الصوديوم فيُستعمل لدراسة تخمر السكاكر والكشف عن الإندول indole production test، وفي عزل ضمات الكوليرا *Vibrio cholera*.

الأوساط نصف الصلبة: التي تُستعمل لاختبار النشاط الانحلالي للجيلاتين عند بعض أنواع الجراثيم كعصيات *Bacillus subtilis*.

الأوساط الصلبة: كالآغار المغذي المحضر في أطباق بتري، والذي يُستعمل لعزل الكائنات الدقيقة وتنقيتها وتمييزها، و كقاعدة لوسط الآغار المدمى أو الآغار الشوكولاتي.

2- الأوساط الغنية enriched media:

تُستعمل هذه الأوساط لاستنبات الكائنات الحية الحساسة التي لا تستطيع النمو في وسط الاستنبات البسيط؛ لأنها تحتاج إلى متطلبات غذائية خاصة لنموها (صعبة النمو fastidious) كالدم أو المصل أو البيض. ويُعرف لهذه الأوساط عدة أنواع منها:

الآغار المدمى blood Agar: يؤمن هذا الوسط المركب من الآغار المعقم المضاف إليه دم أرنب أو إنسان (مأخوذ في شروط عقيمة) منزوع الفيبرين، نمو معظم العصيات الحالة للدم. حيث يُعرف لهذا الانحلال عدة أشكال:

*انحلال تام (الحالة β): المستعمرات محاطة بمناطق فاتحة ناتج انحلال الدم (كالعنقوديات المذهبة *Staphylococcus aureus*، والعقديات *Streptococcus pyogenes*).

*انحلال غير تام أو جزئي (الحالة α): المستعمرات محاطة بمناطق خضراء فاتحة (*Streptococcus pneumoniae*).

*لا يوجد أي أثر لانحلال الدم (الحالة γ): *Staph. epidermidis*، *Enterococcus faecalis*.

الآغار المدمى الشوكولاتي chocolate blood agar: يشبه تحضيره وسط الآغار المدمى مع وجود تغيير بسيط وهو رفع درجة حرارة الوسط (بعد إضافة الدم) إلى الدرجة 100 مئوية لمدة دقيقتين (يؤدي تسخين الكريات الحمراء إلى تحرير المواد الغذائية داخل الخلوية كالهيموغلوبين والهيمين "العامل X" و +NAD "العامل V" وغيرها من المواد التي تحتاجها الجراثيم أثناء نموها). يفيد هذا الوسط في عزل الأحياء الدقيقة الحساسة الممرضة: *Haemophilus influenza* وجراثيم الـ *Neisseria* و *Pneumococci*.

وسط Loeffler's serum: يحوي هذا الوسط على مصل حصان أو مصل خروف. يفيد في استنبات الوتديات *Corynebacterium diphtheriae*.

وسط Dorset's egg: يُستعمل هذا الوسط الذي يحوي على البيض الطازج لعزل عصيات السل التي قد تظهر في عينة السائل الدماغي الشوكي.

وسط Lowenstein–Jensen: هو وسط Dorset's egg الحاوي على أخضر مالاشيت malachite green (يؤدي دور مثبط لنمو الكائنات الأخرى غير جراثيم *Mycobacteria*). يُستعمل هذا الوسط الانتقائي والغني لعزل جراثيم المتفطرات السلية *Mycobacterium tuberculosis* من العينات الملوثة (كالبول والقشع والبراز) بالجراثيم المتعايشة.

وسط Thayer–Martin: يُستعمل هذا الوسط لعزل جراثيم النيسيريا *Neisseria* الممرضة من العينات الملوثة وذلك بعد إضافة عوامل مثبطة لنمو الكائنات الأخرى كال nystatin أو vancomycin .

3- الأوساط الانتقائية والكاشفة selective & detective media:

يحوي الوسط الانتقائي المغذي على مواد تؤمن نمو الأحياء الدقيقة الممرضة المطلوبة وتعيق نمو الكائنات الأخرى، كما يمكن أن يحوي على كاشف أو مشعر يتبدل لونه عند وجود الأحياء المطلوبة.

وسط آغار- ماكونكي MacConkey agar: يدخل في تركيب هذا الوسط: البيتون (يُحفّز على نمو الكائنات)، أملاح الصفراء (تثبط نمو الجراثيم غير المعوية)، لاكتوز (يفيد في اختبار السكر)، الأحمر المعتدل (مشعر درجة حموضة للكشف عن الحمض الناتج عن تخمر السكر حيث يكون لونه أحمر في الدرجة المنخفضة و أصفر في الدرجة المرتفعة)، آغار (يفيد في تصلب الوسط)، يُستعمل من جهة لزراعة الجراثيم المعوية Enterobacteriaceae، ومن جهة أخرى لكشف قدرة الخلية الجرثومية على استقلاب اللاكتوز (فالجراثيم المعوية *E. coli* والكلبسيلا *Klebsiella*" المخمرة لسكر اللاكتوز تنتج مستعمرات ذات لون زهري مائل للاحمرار. في حين تكون مستعمرات الجراثيم *Salmonella* و *Shigella*" غير المخمرة لهذا السكر صفراء اللون شاحبة).

وسط الآغار المدمى – MacLeod's tellurite: يفيد مركب تيلوريت البوتاسيوم المضاف بنسبة 0.02 – 0.04 % إلى وسط الآغار المدمى، في عزل جراثيم *Staphylococcus aureus*، وفي عزل وتنميط جراثيم الدفتريا *Corynebacterium diphtheriae* (التي تفكك التيلوريت وتشكل مستعمرات يتأرجح لونها ما بين الرمادي

والأسود. فتبعاً للون المستعمرات الجرثومية وشكلها، يُميز ثلاثة أنماط حيوية: كثيفة، وسط، ضعيفة).

وسط آغار – deoxycholate citrate: إن إضافة مركب سيترات الصوديوم sodium citrate ومركب sodium deoxycholate إلى وسط الآغار يفيد في تثبيط نمو الفلورا المعوية وتحرض على نمو جراثيم الشغيلا *Shigella* والسالمونيلا *Salmonella* (المسببة للتسمم الغذائي).

4- مستنبت الحليب- مشعر عباد الشمس Litmus – Milk Medium:

يفيد في الكشف عن نشاط الجراثيم المخمرة لسكر اللاكتوز، عن طريق إما إنتاج حمض يغير لون صبغة عباد الشمس من البنفسجي (حالة الاعتدال) إلى الزهري (حالة الحموضة)، ويساهم في ترسيب بروتين الكازئين على شكل خثرة عند إنتاجه بكمية كبيرة (جراثيم العنقوديات المذهبة *S. aureus*)، أو إنتاج غاز يسبب تشكل خثرات صغيرة عديدة عند انطلاقه بكمية كبيرة (كالمطثيات *Clostridium*، اللاهوائية).

ثالثاً: الاستنبات وأشكال المستعمرات الجرثومية:

توجد الكائنات الحية الدقيقة في الطبيعة بصورة مختلطة، ولكي نتمكن من دراسة الأنواع المختلفة من الكائنات الدقيقة وتأثيراتها البيئية وتفاعلاتها مع البيئة والكائنات الأخرى وإمكانية الاستفادة منها يجب عزلها بصورة نقية وفي شروط عقيمة خالية من أي تلوث بكائنات أخرى، بحيث تنمو كل خلية مكونة مستعمرة Colony من عدة خلايا وكل مستعمرة منفصلة عن غيرها. ونحصل على هذه المستعمرات من خلال استنبات الكائنات الدقيقة و تنميتها على بيئات صلبة.

1- الاستنبات

هناك عدة طرق يمكن اتباعها لتحقيق غرض الحصول على أنواع محددة من الكائنات الدقيقة مع الأخذ بالحسبان أن هناك أوساطاً غذائية (اصطفائية) يمكن لنوع معين من الكائنات الدقيقة النمو عليها دون غيرها من الأنواع. وتجدر الإشارة إلى ضرورة تحضير أوساط الاستنبات في شروط عقيمة وإجراء جميع خطوات الاستنبات ضمن غرفة زرع

جرثومي وأمام اللهب تفادياً لحدوث أي تلوث جانبي. من الطرق المستخدمة لعزل الكائنات الدقيقة:

أ- طريقة التخطيط على سطح الآغار المتصلب streak plate method

يُستعمل في هذه الطريقة عملية تخفيف غير مباشرة تهدف إلى التفريق بين الخلايا ذات العدد الكبير، وذلك باستعمال ما يُعرف بإبرة التلقيح ذات العقدة needle loop أو إبرة التلقيح المعقوفة bent needle وذلك بنشر الخلايا على سطح البيئة الغذائية في الطبق وهذا ما يُعرف بالتخطيط streaking.

من الطرق الشائعة في التخطيط على الأطباق ما يأتي:

- التخطيط المتعرج الأحادي: يهدف إلى الحصول على أنواع مفردة من الكائنات الدقيقة.
- التخطيط المتعرج الثلاثي: يهدف إلى الحصول على أنواع مفردة من الكائنات الدقيقة ويمكن استعمال هذه الطريقة للحصول على مستعمرات أكثر تباعداً ونقاءً.
- التخطيط المتوازي: يساعد في الحصول على مستعمرات متفرقة وكذلك يمكن استعمالها في تجارب دراسة العلاقات البيئية بين الكائنات الدقيقة.
- التخطيط المتقاطع (مستقيماً أو متعرجاً).

عموماً، تبدأ عملية التخطيط على الأطباق بأخذ قطرة بإبرة التلقيح من حافة طبق مزروع عليه جراثيم مسبقاً، أو من أنبوب فيه بيئة سائلة تحتوي على نمو جرثومي، بحيث تبدأ بالتخطيط من الجهة البعيدة عنك في الطبق إلى الجهة القريبة منك، ذهاباً وإياباً بخطوط متوازية ملامساً سطح الآغار.

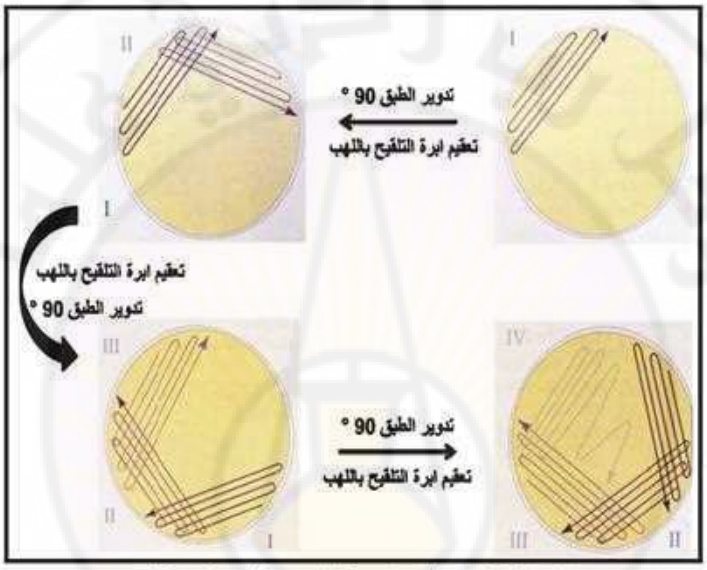
المواد والأدوات اللازمة:

أطباق بتري – الوسط الزرعي – إبرة تلقيح ذات العقدة وأخرى مستقيمة – أنابيب اختبار معقمة – (أوساط زرعية للجراثيم والفطريات) – لهب (مصباح كحولي).

طريقة العمل:

قبل البدء بالعمل يجب مراعاة ظروف التعقيم لجميع المواد والأدوات المستعملة.

- خذ من المزرعة المختلطة مسحة من على سطح أحد المستعمرات بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة مع مراعاة شروط التعقيم (التعريض إلى اللهب والتبريد).
- ارفع غطاء طبق بتري محتوٍ على الوسط الغذائي بالقرب من اللهب ثم خطط سطح الآغار بالطريقة الأولى.
- كرر الخطوة الثانية باتباع الخطوات الثلاث الأخرى في التخطيط (الشكل 54).



الشكل 54: الخطوات المتبعة في تخطيط سطح الآغار

- قُم بحضن الأطباق في الحاضنة على الدرجة 37 درجة مئوية. ثم افحص بعد 24 ساعة ثم بعد 48 ساعة.

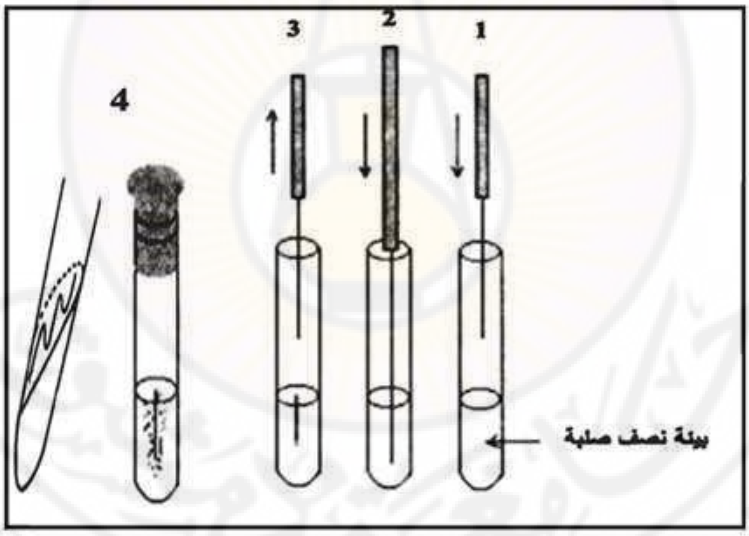
ب- طريقة التخطيط على سطح الآغار المائل في الأنابيب

تهدف هذه الطريقة إلى عزل المستعمرات المختلطة بصورة نقية كما يمكن استعمالها لحفظ الأنواع النقية من الكائنات الدقيقة لفترة طويلة لاستعمالها عند الحاجة وكذلك لمعرفة طبيعة الحركة أثناء نمو الجراثيم على الآغار المائل وتحديد صفات المستعمرة.

تُحضر هذه الأنابيب بصب بيئة محتوية على الآغار وهي في حالة سائلة، ثم يجري وضعها في المعقم (الموصد autoclave). وتوضع الأنابيب بعد التعقيم بشكل مائل وهي في حالة سائلة بحيث يتشكل لدينا سطح مائل من الوسط الغذائي ثم يُترك ليبرد ويتصلب.

طريقة العمل:

- عقِّم إبرة التلقيح ذات العقدة باللهب ثم اتركها تبرد.
- المس المستعمرة الفردية المراد نقل جزء منها إلى سطح الآغار المائل.
- ارفع غطاء الأنبوب باستعمال الإصبع الصغير لليد الأخرى وعقِّم فوهة الأنبوب بتعريضه للهب.
- انشر اللقاح على سطح الآغار المائل بالتخطيط المتعرج أو بعمل خط مستقيم على سطح البيئة من الأسفل إلى الأعلى (الشكل 55).
- عقِّم فوهة الأنبوب مرة أخرى ثم أغلق الأنبوب جيداً.
- كرِّر العملية باستعمال أنواع أخرى من البكتيريا.
- ضع الأنابيب في الحاضنة على الدرجة 37° م لمدة تتراوح بين 24 و 48 ساعة.



الشكل 55: يبيّن التلقيح على الوسط المائل

ج – تلقيح الآغار العميق (المستوي):

تهدف هذه الطريقة لمعرفة طبيعة الحركة في النمو البكتيري وتوفير الوسط اللاهوائي لنمو الجرثوم.

طريقة العمل:

- عقِّم الإبرة المستقيمة باللهب ثم اتركها تبرد.
- المس المستعمرة المراد نقل جزء منها إلى الآغار العميق (نصف الصلب).
- ارفع غطاء الأنبوب باستعمال الإصبع الصغير لليد الأخرى وعقِّم فوهة الأنبوب بتعريضه للهب.
- أدخل (وخز) السلك المستقيم المحتوي على اللقاح من المنتصف حتى ثلثي الأنبوب ثم اسحب السلك بعناية ثم أغلق الأنبوب جيداً.
- كرِّر العملية باستخدام أنواع أخرى من البكتيريا.
- احضن الأنبوب في الحاضنة على الدرجة 37 ْم لمدة تتراوح بين 24 و 48 ساعة.

د- تلقيح الوسط السائل في أنابيب:

يمكن من خلال هذه الطريقة معرفة طبيعة البكتيريا من حيث احتياجها للهواء (هوائية أو لاهوائية) وذلك بملاحظة النمو داخل البيئة وكذلك ملاحظة طبيعة والنمو السطحي وكثافته، أو تكون الراسب في الأنبوب ومدى العكارة الناتجة من النمو البكتيري وذلك لتقدير النمو الجرثومي.

طريقة العمل:

- عقِّم إبرة التلقيح ذات العقدة باللهب ثم اتركها تبرد.
- المس المستعمرة المراد نقل جزء منها إلى الآغار السائل.
- ارفع غطاء الأنبوب باستعمال الإصبع الصغير لليد الأخرى وعقِّم فوهة الأنبوب.
- اخلط اللقاح مع البيئة في الأنبوب جيداً ثم ضع الغطاء بعد تعقيمه.
- كرِّر العملية باستعمال أنواع مختلفة من الجراثيم.
- ضع الأنابيب في الحاضنة على الدرجة 37 ْم لمدة تتراوح بين 24 و 48 ساعة.

هـ- طريقة الأطباق المصبوبة Pour plate method

يمكن هنا الحصول على المستعمرات النقية من خلال اختلاط البيئة مع العينة (الكائن الدقيق) كلياً وتظهر بعض المستعمرات على السطح وبعضها يكون مدفوناً في الوسط

الغذائي وذلك بعد حضنها. تتم عملية التلقيح والآغار لا يزال سائلاً (توضع العينة في طبق الزرع ويُصب فوقها الآغار أو توضع العينة في أنبوب الزرع الحاوي على الوسط).

يُصاحب هذه الطريقة عادة استعمال تخفيف للعينة الأصلية للحصول على مستعمرات منتشرة بشكل جيد للتمكن من الدراسة والحصول على النتائج بشكلٍ جيد.

طريقة العمل:

- عقِّم ابرة التلقيح ذات الحلقة وخذ مسحة من اللقاح المراد أخذ العينة منه وكرِّر العملية مرتين.
- خذ أنبوباً يحتوي على ماء معقم ومقطر أو ماء ببتوني وافتح الأنبوب ثم اخلط اللقاح بالماء جيداً بطرقه بواسطة الأصبع أو بلفه بين راحتي اليد.
- خذ طبق بتري وضع فيه 1 مل من الأنبوب بواسطة ماصة نظيفة معقمة وضعها في الطبق ثم صب الآغار وهو سائل (حرارته 45 درجة مئوية) ومن ثمّ اخلط جيداً بحركة دائرية خفيفة تارة مع حركة عقارب الساعة وتارة عكس عقارب الساعة.
- اترك الطبق حتى يتصلب. ثم ضعه في الحاضنة على الدرجة 37°م لمدة تتراوح بين 36 و 48 ساعة.

كما أسلفنا سابقاً يمكن عمل عدة تخفيفات للعينة الأصلية للحصول على مزارع منفصلة حتى يسهل التعامل معها ثم تكرار الخطوات السابقة لكل تخفيف.

و- طريقة الأطباق المنتشرة Spread plate method

يمكن استعمال هذه الطريقة للحصول على نمو كثيف يغطي سطح الطبق كاملاً لاستعماله في الدراسات الفيزيولوجية للكائنات الدقيقة مثل تحلل المواد الغذائية بالأنزيمات الميكروبية ودراسة تأثير العوامل البيئية وبعض المواد على نمو الكائنات الدقيقة.

وتتم هذه العملية بنشر النمو على سطح الوسط الغذائي المتصلب بشكل كامل على خلاف طريقة التخطيط أو طريقة الأطباق المصبوبة.

طريقة العمل:

- عقِّم إبرة التلقيح ذات العقدة وخذ مسحة من اللقاح المراد أخذ العينة منه وكرِّر العملية مرتين.

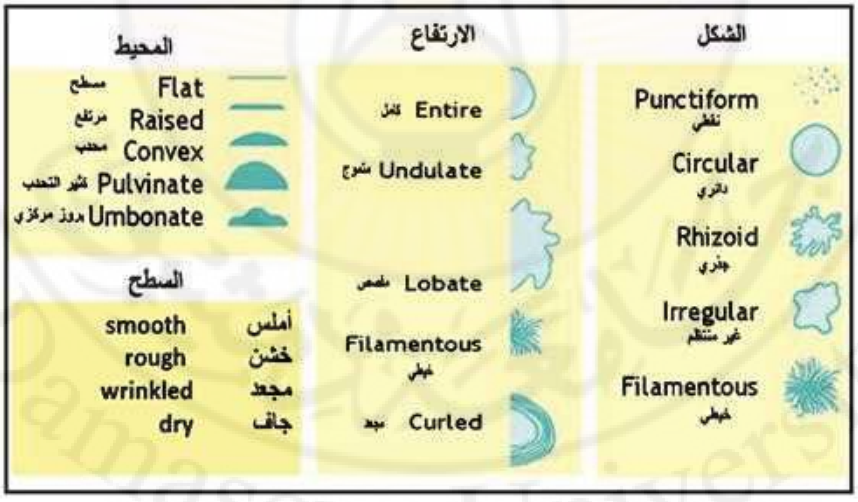
- خذ أنبوباً محتوياً على ماء معقم ومقطر وافتح الأنبوب ثم اخلط اللقاح بالماء جيداً.
- خذ طبق بتري محتوياً على الآغار المغذي المتصلب وضع على سطح البيئة 0.1 مل من الأنبوب.
- خذ ساقاً زجاجية معقوفة معقمة وقم بفرد اللقاح على سطح الآغار المغذي جيداً.
- ضع الطبق في الحاضنة على الدرجة 37° م لمدة تتراوح بين 36 و 48 ساعة.

2- أشكال المستعمرات الجرثومية

نظراً لإمكانية تأثر شكل المستعمرة الجرثومية بالشروط التي يتم فيها استنبات النوع الجرثومي، لابد من ذكر هذه الشروط بدقة (كنوع الوسط، درجة حرارة الحضن ... الخ). حيث أن دراسة صفات مستعمرات الجراثيم يساعد في التعرف على أنواع الجراثيم المختلفة.

أ- مظاهر النمو الجرثومي على البيئات الصلبة

تتم دراسة المستعمرة الجرثومية (الشكل 56-57) باستعمال عدسة يدوية أو المجهر المقلوب من أجل تحديد النقاط المبينة بالشكل 56 إضافة إلى:



الشكل 56: مظاهر المستعمرات الجرثومية في الأوساط الصلبة

كثافة النمو: لا يوجد نمو، نمو ضئيل، نمو متوسط، نمو غزير.

الصفات الضوئية: عاتمة (لا تسمح للضوء بالمرور خلالها)، نصف شفافة (تسمح للضوء بالمرور خلالها ولا تسمح بالرؤية الكاملة للأشياء خلفها)، شفافة.

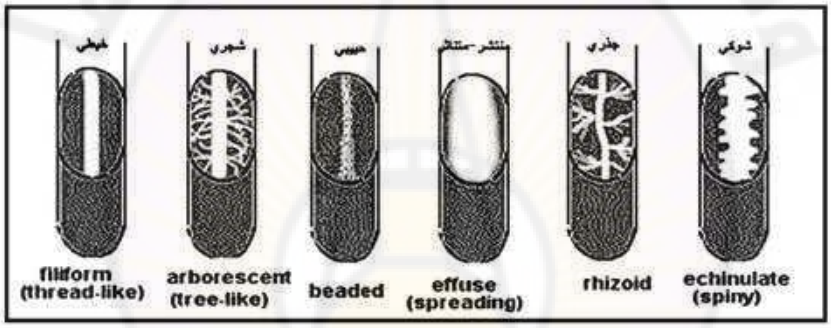
قوام المستعمرة: لزجة (يعلق النمو البكتيري بالإبرة)، غشائية (تزول المستعمرة تماما بالإبرة)، هشة (تتكسر بمجرد لمس الإبرة).

اللون: تفرز بعض أنواع الجراثيم أصبغة غير منحلة في الماء تلون المستعمرات ولا تلون الوسط. قد تتلون المستعمرة بالأبيض، الأصفر، الأحمر ، البني، الوردي، الأرجواني...الخ. في حين تفرز أنواع أخرى أصبغة منحلة في الماء تلون الوسط ولا تلون المستعمرات.

الشكل 57: أشكال مستعمرات بعض الأنواع الجرثومية المستنبتة في الأوساط الصلبة

ب- مظاهر النمو الجرثومي على المستنبت المائل (الآغار المغذي المائل):

يفيد الاستنبات على الأوساط المائلة في التعرف على طبيعة نمو الكائنات الحية الدقيقة وفي الحفاظ على المستنبتات لمدة طويلة (مستنبتات أم). تُبدي الكائنات الحية المستنبتة على هذه الأوساط (تلقيح بشكل مستقيم من الأسفل إلى الأعلى بإبرة التلقيح ومن ثمّ الحضن في شروط مناسبة) مظاهر نمو مختلفة: خيطي (نمو متماثل على جانبي خط التلقيح)، شجري (يشبه الشجرة)، حبيبي (مستعمرات عديدة منفصلة أو شبه متصلة على طول خط التلقيح)، منتشر (النمو يزداد بعيداً عن خط التلقيح)، جذري (متفرع يشبه الجذور)، شوكي (يشبه الأشواك)، (الشكل 58).

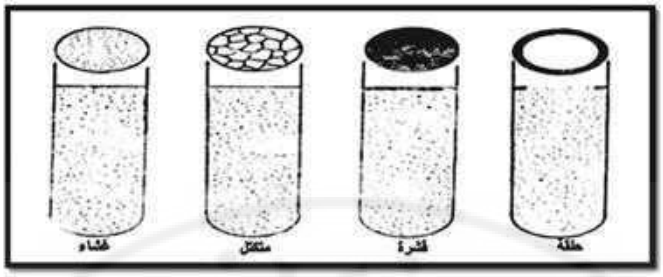


الشكل 58 : أنماط نمو الجراثيم على الأوساط المائلة

ج- مظاهر النمو الجرثومي في المستنبت السائل (المرق المغذي):

تُقدَّر كمية نمو الكائن الحي في الوسط السائل، بعد خض الأنبوب جيداً، بحسب العكارة (لا يوجد نمو، نمو ضئيل، نمو متوسط، نمو غزير) أو باستعمال جهاز مقياس الطيف الضوئي spectrophotometer. أما من ناحية طبيعة النمو، فنلاحظ ما يأتي:

- نمو على السطح (حلقي على حافة الأنبوب، أو شكل قشرة رقيقة تغطي سطح الوسط، أو نمو غشائي يغطي سطح المستنبت أو مجعد على شكل كتل متماسكة على السطح)، (الشكل 59).



الشكل 59 : أنماط نمو الجراثيم على الأوساط السائلة

- نمو تحت السطح (لا يوجد نمو، أو عكر "سحابي"، أو حبيبي "حبيبات صغيرة").
- الراسب إما أن يكون معدوماً أو يتفاوت حجمه من قليل إلى كثيف، ويكون له أشكال مختلفة (حبيبي أو قشري، أو متكتل، أو لزج).

التطبيق العملي

خذ القراءات التي تحصل عليها في كل تجربة مراعياً شكل المستعمرات وطبيعة النمو مستعيناً بعمل جدول خاص لكل عمل وكذلك استخدام الرسم لتوضيح النتائج.

شكل المستعمرة	
ارتفاع المستعمرة	
حافة المستعمرة	
سطح المستعمرة	
الصفات الضوئية	
قوام المستعمرة	
كمية النمو	
لون المستعمرة	

ملاحظة:

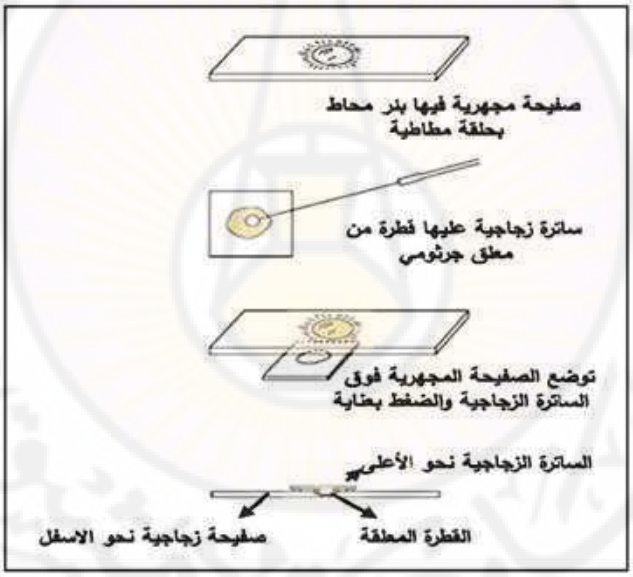
للتأكد من أن عمليات العزل جرت بنجاح وتم الحصول على مستنبتات نقية، لا بد من فحص المستعمرات النامية. إذا كانت جميع الخلايا متشابهة في الشكل والحجم تكون عملية العزل ناجحة.

الفصل الثاني

طرق التلوين

تُفحص الجراثيم مجهرياً بشكل عام عن طريق تحضير القطرة المعلقة لدراسة حركتها أو في عينة مثبتة (ميتة) وملونة لفحص شكلها وبنيتها وانتظامها (بتطبيق التلوين المباشر البسيط أو غير المباشر السلبي).

يُبيّن الشكل 60 مراحل تحضير القطرة المعلقة، لملاحظة حركية الكائنات الحية الدقيقة، وذلك تبعاً للخطوات الآتية:



الشكل 60: مراحل تحضير القطرة المعلقة

إلاّ أن صعوبة رؤية الجراثيم غير الملونة، وتحديد نوعها بشكل واضح يجعل من الضروري اللجوء إلى التلوين الذي يساعد على: ملاحظة الكائنات الحية المستنبتة وما يحيط بها، التمييز بين أنواع الجراثيم من حيث الشكل والانتظام، و مشاهدة السياط أو المحفظة أو الأبواغ الداخلية (في حال وجودها).

قبل البدء بعملية التلوين، لابد من التعرف على طريقة تثبيت العينة أو العزلة (الحاوية على الكائنات الحية) على صفيحة زجاجية مجهرية. فالعينة غير المثبتة بشكل جيد تزول عند الغسيل بالماء أو عند استعمال أي محلول آخر.

تعتمد طريقة التثبيت بالتسخين، على تمرير الصفيحة الزجاجية الحاملة للعينة بعد تجفيفها جيداً في الهواء الجاف بدرجة حرارة الغرفة، خلال لهب مصباح كحولي عدة مرات (من 3 إلى 4 مرات)، حيث يساعد التسخين على التصاق الكائنات الحية الدقيقة على سطح الصفيحة بسبب تخثر بروتيناتها.

فعند تحضير عينة مستنبتة في وسط سائل (معلق جرثومي، قشع، قيح، بول)، يؤخذ بواسطة أداة العزل المعقمة قطرة من وسط الاستنبات وتُفرش على سطح صفيحة مجهرية نظيفة، ومن ثم تترك الصفيحة لتجف تماماً في الهواء تمهيداً لتثبيت العينة بالتسخين من خلال تمرير الصفيحة بسرعة خلال اللهب (3 – 4 مرات).

أما عند تحضير عينة مستنبتة في وسط صلب (كالآغار)، توضع في البداية قطرة من الماء المعقم في وسط صفيحة مجهرية، ثم تُؤخذ بواسطة أداة العزل العقيمة كمية من وسط الاستنبات الصلب وتخلط جيدا مع قطرة الماء لتُفرش فيما بعد على سطح الصفيحة. تترك العينة في الهواء لتجف تمهيداً لتثبيتها بالتسخين من خلال تمرير الصفيحة بسرعة خلال اللهب من 3 إلى 4 مرات (الشكل 61).

الشكل 61: مراحل تحضير وتثبيت عينة مأخوذة من مستنبت سائل ومستنبت صلب

ولفهم آلية عمل الملون، لا بد من تسليط الضوء على الطبيعة الكيميائية والفيزيائية للملونات التي تُعد مركبات ملحية مؤلفة من شاردتين (شاردة موجبة وأخرى سالبة)، تكون إحداهما ملونة (أزرق الميتلين عبارة عن مركب كلور أزرق الميتلين الذي يتفكك في الماء إلى شاردة أزرق الميتلين موجبة الشحنة زرقاء اللون) والثانية سالبة الشحنة عديمة اللون (شاردة الكلور).

تُقسم الملونات إلى مجموعتين، الأولى قلوية تكون فيها الجزيئة الملونة مشحونة إيجابياً (أزرق الميتلين Methylene Blue، بنفسجي كريستال Crystal Violet أو بنفسجي جانسن Gentian Violet، السفرانين Safranin) وتستعمل في طرق التلوين المباشر، والثانية حامضية تكون الجزيئة الملونة فيها مشحونة سلباً (أحمر كونغو Congo Red، الايوزين Eosine، الـ Nigrosin) وتستخدم في طرق التلوين غير المباشر.

1- طريقة التلوين المباشر أو البسيط:

يساعد التلوين المباشر في ملاحظة الشكل الخارجي للجراثيم. ويتم فيه بشكل عام:

- غمر العينة المأخوذة من المستنبت الصنعي (المثبتة بالتسخين) بالملون القلوي لفترة زمنية تتفاوت تبعاً لنوع الملون المستعمل (يحتاج بنفسجي كريستال من 20 إلى 30 ثانية والفوكسين الفحمي Carbol-Fuchsin من 5 إلى 10 ثواني وأزرق الميتلين من 60 إلى 90 ثانية)
- غسلها بالماء المقطر (لعدة ثواني) وتجفيفها بورق الترشيح ليُصار إلى فحصها مجهرياً.

حيث يرتبط الجزيء الملّون المشحون إيجابياً مع سيتوبلاسما الخلية الجرثومية المشحونة سلبياً عند نموها في وسط استنبات معتدل درجة الحموضة.

كما يمكن إجراء هذا النوع من التلوين على عزلة أو مسحة مأخوذة بأداة معقمة مزودة بنهاية قطنية sawb (بعد حك داخل الفم واللثة) لمشاهدة الفلورا الطبيعية الفموية، حيث يتم ذلك على النحو الآتي:

- مد العزلة على صفيحة زجاجية نظيفة وتجفيفها في الهواء بدرجة حرارة الغرفة ومن ثم تثبيتها بالتسخين.
- غمر العينة بملون بنفسجي كريستال لمدة 30 ثانية.
- غسل العينة جيداً بالماء المقطر (5 ثواني) وتجفيفها لدراستها مجهرياً (تلاحظ الخلايا الظهارية على التكبير ×10 في حين تشاهد جراثيم الفلورا على التكبير ×100).

2-طريقة التلوين غير المباشر أو التلوين السلبي:

يُطبق هذا النوع من التلوين عند دراسة الجراثيم الحساسة للحرارة والتي تتخرب لدى تعرضها للتسخين من أجل التثبيت (كجراثيم اللولبيات الشاحبة *Treponema pallidum* المسببة للداء الإفرنجي). وهو يفيد في تحديد حجم وشكل وانتظام الجراثيم دون اللجوء إلى التسخين (الذي يمكن أن يسبب تغييراً نسبياً في شكل الخلايا). وتعتمد هذه الطريقة على مزج الخلايا الجرثومية مع ملون حامضي (الـ Nigrosin أو الإيوزين) يلون الخلفية المحيطة بالخلية الجرثومية التي تبقى عديمة

اللون لعدم قدرة هذا الملون على الارتباط مع سيتوبلاسماها. حيث تتبع الخطوات العملية الآتية:

– وضع قطرة من ملون الـ Nigrosin على أحد جانبي صفيحة زجاجية نظيفة. وضع كمية صغيرة (عزلة) من الجراثيم المستنبتة فوق قطرة الملون والمزج جيداً بواسطة أداة أخذ العينة.

– أخذ صفيحة زجاجية ثانية ووضعها على الصفيحة الأولى بزاوية 45° لتلامس برفق القطرة النهائية حتى تنتشر على طول حافة التماس بين الصفيحتين.

– زلق الصفيحة الثانية على الأولى بسرعة مع ممارسة ضغط مختلف (أثناء عملية الزلق) بحيث تنتشر القطرة على الصفيحة الأولى مكونة مناطق متباينة في سماكتها.

– تجفيف الصفيحة مباشرة بالهواء الجاف دون اللجوء إلى التسخين تمهيداً لفحصها مجهرياً على التكبير ×100 باستعمال إنارة خفيفة لمشاهدة الخلفية الملونة بالبنفسجي الفاتح.

3- ملون غرام Gram stain

يُستعمل ملون غرام واسع الانتشار في تلوين أكثر أنواع الجراثيم والفطور وبعض أنواع الطفيليات (كالمشعّرة *Trichomonas* والإسطوانيات *Strongyloides*).

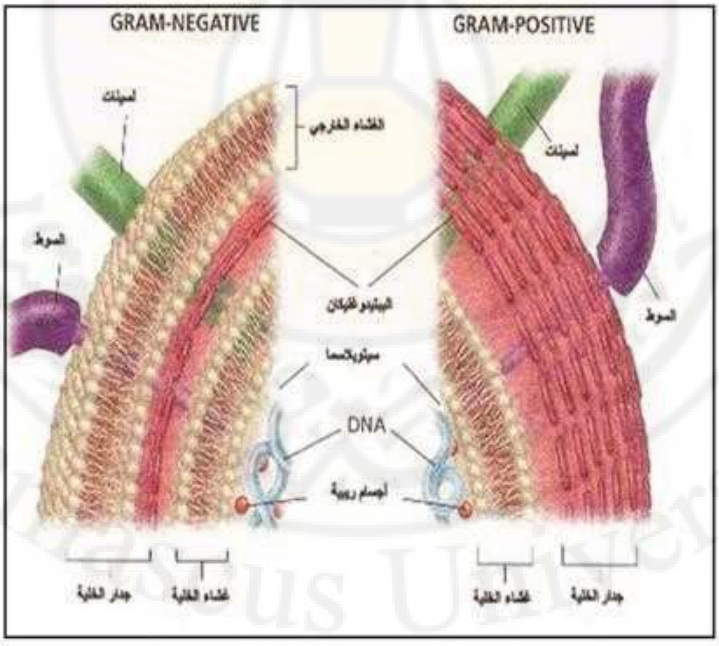
ويُميز هذا الملون شكلياً بين مجموعتين من الجراثيم: موجبة غرام تتلون باللون البنفسجي وسالبة غرام تتلون باللون الزهري أو الأرجواني.

تعتمد آلية عمل ملون غرام بشكل عام، على الاختلاف العميق الموجود في بنية جدار الخلية الجرثومية (المسؤول عن حمايتها و إعطائها الشكل والحجم).

يكون جدار الخلية الجرثومية موجبة غرام سميكاً (تتراوح سماكته بين 20 و 80 نانومتر) وهو يتألف من عدة طبقات متصلة من الببتيدوغليكان peptidoglycan (تتراوح نسبة وجوده بين 60 و 90% في جدار الخلية) إضافة إلى وجود حمض التايكوييك

teichoic acid (المركب من الغليسيرول والفوسفات والريبيتول الكحولي السكري) داخل الجدار (قد يمتد أحياناً نحو الخارج) الذي يمكن له أن يرتبط بالشحوم. يُغطي السطح الخارجي لطبقات الببتيدوغليكان جزيئات بروتينية تختلف في تركيبها تبعاً للسلالات والأنواع الجرثومية (الشكل 62).

في حين يتألف جدار الخلية الجرثومية سالبة غرام (الشكل 62) من طبقتين إلى ثلاث طبقات من الببتيدوغليكان (تتراوح نسبة وجوده من 10 إلى 20% في جدار الخلية) التي تُحاط بغشاء خارجي يدخل في تركيبه كل من الفوسفوليبيد (يوجد في الناحية الداخلية من الغشاء) والبروتين الشحمي (يربط الغشاء الخارجي إلى طبقات الببتيدوغليكان) وعديد السكاكر الشحمي (يوجد في الناحية الخارجية من الغشاء ويكون مؤلفاً من قسم شحمي منغرس في الغشاء وقسم عديد سكاكر ممتد خارج الغشاء) والبروتين (يوجد في الغشاء ويختلف تركيبه باختلاف الخلية الجرثومية).



الشكل 62: الفرق بين جدار الجراثيم موجبة غرام والجراثيم سالبة غرام

يُستعمل لتطبيق ملون غرام مستنبتات صنعية يتراوح عمرها بين 18 و 24 ساعة. ويُبين الشكل 63 مختلف مراحل التلوين بملون غرام للعينة بعد تحضيرها وتثبيتها بالتسخين.

– استعمال ملون بنفسجي كريستال الذي يلون كلا النمطين من الجراثيم باللون البنفسجي.

– معالجة الجراثيم بمحلول الإيودين iodine لتشكيل معقد (إيودين – بنفسجي كريستال Cristal violet–iodine) غير منحل، مع بقاء الجراثيم ملونة باللون البنفسجي.

– إزالة اللون باستعمال مزيج من الأسيتون والإيتانول، حيث يتم التمييز بين الجراثيم موجبة غرام (تبقى محتفظة بالمعقد الملّون الذي يعطيها اللون البنفسجي) والجراثيم سالبة غرام (تصبح عديمة اللون بسبب فقدانها للمعقد الملّون).

– إضافة السفرانين أو الفوكسين، الذي يعطي الجراثيم سالبة غرام اللون الزهري أو الأرجواني، في حين لا تتأثر الجراثيم موجبة غرام وتبقى محتفظة بلونها البنفسجي.

تُفسر آلية عمل الملّون في الجراثيم موجبة غرام بتشكيل معقد ملّون غير منحل، كبير الحجم يبقى داخل الخلية حتى بعد إضافة مزيل اللون (مزيج الأسيتون والإيتانول) الذي يؤدي إلى نزع جزيئات الماء من الجدار الخلوي مسبباً جفافه وبالتالي تقليص المسافة بين جزيئات الببتيدوغليكان الأمر الذي يشكل حاجزاً مانعاً لخروج المعقد من الخلية الجرثومية.

أما في مجموعة الجراثيم سالبة غرام يستطيع المعقد الملّون (إيودين – بنفسجي كريستال) مغادرة الخلية الجرثومية بعد انحلال غشائها الخارجي وتخرب الغشاء السيتوبلاسمي المرتبط بطبقات الببتيدوغليكان عند إضافة مزيل اللون (مزيج الأسيتون والإيتانول من المحلات الشحمية).

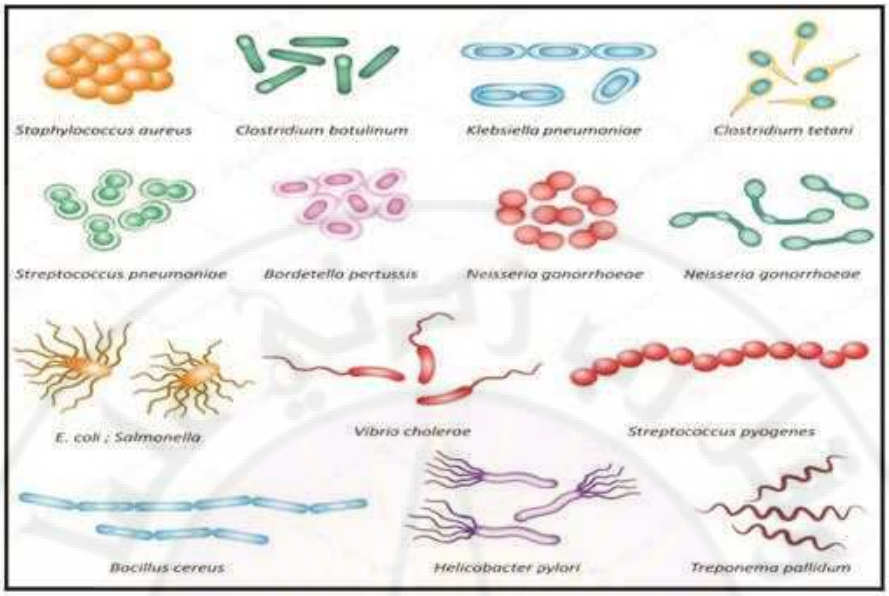
الشكل 63: مراحل التلوين بملون غرام

وتجدر الإشارة إلى إمكانية الحصول على نتائج خاطئة بسبب تحول غرام الإيجابي إلى السلبي تحت تأثير إحدى العوامل الآتية: تعريض العينة إلى التسخين الشديد أثناء تثبيتها،

أو ترك العينة في مزيل اللون فترة زمنية طويلة، أو غسيل العينة بالماء لمدة طويلة، أو استعمال مستنبتات كهلة. حيث تفقد المستنبتات التي عمرها أكثر من 24 ساعة، قدرتها على الاحتفاظ بالمعقد الملّون بسبب تعرض غلاف الخلايا المستنبتة إلى التخريب بفعل الأنزيمات الناتجة مع تقدم عمرها.

يُحدد في نهاية عملية التلوين الشكل المورفولوجي للخلايا الجرثومية في اللطاخات الملونة (عقدياً "كروياً"، عصوياً "عصيات مستقيمة"، حلزونياً غير مكتمل "عصوياً ملتفاً أو شكل الضمة"، حلزونياً "عصيات حلزونية غير مرنة"، ملتوياً "عصيات حلزونية مرنة") بالإضافة لتحديد نوعها سلبية أو إيجابية الغرام. ويبيّن الشكل 64 والشكل 65 مظهر الخلايا الجرثومية وأشكال بعض الأنواع الجرثومية.

الشكل 64: الأشكال المورفولوجية المختلفة للخلايا الجرثومية



الشكل 65: أشكال بعض أنواع الجراثيم

4-ملون زايل نلسون Ziehl –Neelson stain:

يُستعمل هذا الملون في المختبرات الطبية لتمييز: أنواع الجراثيم التابعة لجنس المتفطرات *Mycobacterium* (*M. leprae*, *M. tuberculosis*) وأنواع الفطور التابعة لجنس النوكارديا *Nocardia* (*N. asteroids*, *N. brasiliensis*) وطفيلي الكريبتوسبوريديوم *Cryptosporidium* المسبب للإسهال عند الإنسان؛ لأن هذه الكائنات تحتوي داخل جدرانها على كمية كبيرة من المواد الدهنية التي تدعى بالحموض الميكولية mycolic acids.

تتلون هذه الكائنات باللون الأحمر عند تسخينها مع ملون الفوكسين الفحمي carbol–fuchsin. يفيد التسخين في زيادة مرور الملون إلى داخل الخلية، وبالتالي لا يتم التخلص من الملون عند استعمال مزيل اللون (كحول حامضي أو حمض قوي) وذلك بسبب غنى جدارها الخلوي بالليبيدات أو المواد الدسمة.

الشكل 66: المراحل المختلفة لتلوين عصيات السل (المتفطرات السلية)

يفيد ملون زايل نلسون في الكشف عن عصيات السل (التي تتلون باللون الأحمر)، فبعد تحضير العينة (العزلة) وتجفيفها ومن ثم تثبيتها بالتسخين على صفيحة زجاجية، يتم تلوينها تبعاً للخطوات الواردة في الشكل 66.

كما يمكن تطبيق طريقة Ziehl–Neelson المعدلة في كشف عصيات الجذام *M. leprae*، وذلك باتباع كافة الخطوات السابقة واستعمال حمض الكبريت 5% (كمزيل لون).

وهناك طريقة التلوين البارد أو طريقة Kinyound التي يمكن تطبيقها أيضاً وهي تتضمن المراحل الآتية:

- تحضير العينة وتجفيفها وتثبيتها بالتسخين.

- غمر العينة بمزيج لوني (الفوكسين الفحمي و tergitol) لمدة 5 دقائق.
- إضافة مزيل اللون (الكحول الحامضي) لمدة تتراوح بين 10 و 30 ثانية.
- غسيل متكرر بالماء حتى الحصول على سائل شفاف.
- إضافة أزرق الميتيلين القلوي لمدة دقيقتين.
- غسيل الصفيحة بالماء ومن ثم تجفيفها بورق الترشيح تمهيداً لفحصها مجهرياً.

5- تلوين المحفظة Capsule stain:

تفرز بعض أنواع الجراثيم طبقة مخاطية لزجة تُعرف بالمحفظة التي تختلف في تركيبها (عديد سكاكر أو عديد ببتيد أو كلاهما معاً) وسماكتها من نوع إلى آخر. ويعتمد تشكلها على الشروط الغذائية المحيطة بالخلية الجرثومية. تساعد المحفظة الخلية الجرثومية على العيش في الطبيعة وحمايتها من الجفاف وتأمين مخزونها الغذائي. كما تؤدي دوراً هاماً من جهة في حماية الجراثيم من حادثة البلعمة (التي تتم في الخلايا البلعمية للمضيف) ومن جهة أخرى في تأمين التصاقها بالأسطح الخلوية لمنع التخلص منها من قبل المضيف.

يساعد وجود المحفظة في تشخيص العديد من الجراثيم (*Bacillus anthracis*, *Strep. mutans*, *Strep. pneumoniae*) وبعض أنواع الفطور (*Cryptococcus neoformans*) وتحديد شدتها الإمراضية. فالكائنات الحية الدقيقة المحاطة بمحفظة سميكة تكون شديدة الإمراضية بالمقارنة مع الكائنات الأخرى المجردة منها أو المحاطة بمحفظة رقيقة، وتُستعمل طرائق عديدة في تلوين المحفظة، لا يستعمل فيها التسخين على الإطلاق منعاً لحدوث تخريب للمحفظة.

طريقة Anthony

تعتمد هذه الطريقة التي تُطبق على مستنبتات سائلة (مرق مع حليب خالي الدسم)، على استعمال كاشفين الأول بنفسجي كريستال الذي يعطي الخلية والمحفظة لوناً بنفسجياً غامقاً، والثاني كبريتت النحاس الذي يلعب دوراً في إزالة الفائض من الكاشف الأول من

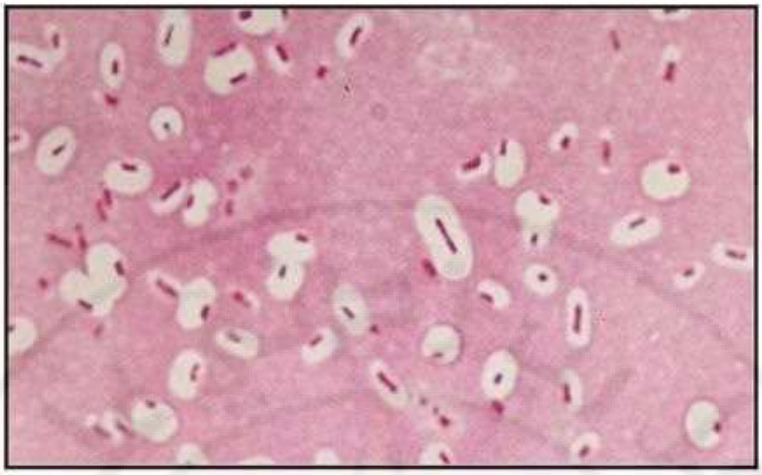
المحفظة (لعدم احتوائها على شوارد تساعد في تثبيت الملون) وتلوينها بالأزرق الباهت أو الزهري الفاتح. تشتمل هذه الطريقة على المراحل الآتية:

- وضع 3 قطرات من المستنبت بعد مزجه جيداً بواسطة أداة معقمة على صفيحة زجاجية.
- مد العينة على كامل سطح الصفيحة وتركها لتجف في الهواء الجاف.
- غمر العينة بملون بنفسجي كريستال لمدة تتراوح بين 1 و 7 دقائق ومن ثم غسيلها عدة مرات بكبريتات النحاس (20%).
- تجفيف الصفيحة بورق الترشيح وفحصها تحت المجهر باستخدام العدسة الغاطسة.

طريقة Graham & Evans:

تشتمل هذه الطريقة على المراحل التالية:

- مزج كمية ضئيلة من المستنبت السائل (ما يعادل حلقتين من أداة الاستنبات) مع قطرة أو قطرتين من الحبر الهندي على طرف صفيحة زجاجية.
- مد العينة على كامل سطح الصفيحة وتركها لتجف في الهواء الجاف.
- غسيل العينة بالماء المقطر بعناية لمدة 5 ثواني.
- غمر العينة بمحلول بنفسجي كريستال لمدة دقيقة ومن ثم غسيلها بالماء المقطر لمدة 5 ثواني.
- غمر العينة بالسفرانين لمدة دقيقة ونصف، ثم غسيلها بالماء المقطر لمدة 5 ثواني.
- تجفيف الصفيحة بورق الترشيح وفحصها تحت المجهر (تتلون الخلية باللون الزهري إلى الأحمر وتحاط بمنطقة شفافة عند وجود المحفظة)، (الشكل 67).



الشكل 67: يبيّن المنطقة الشفافة (المحفظة) حول الخلية

طريقة ملون ليشمان Leishman stain:

تساعد هذه الطريقة في الكشف عن الكائنات الحية داخل النسج (جراثيم *Bacillus anthracis*) وعن جراثيم اليرسينيا *Yersinia pestis*. وتشتمل هذه الطريقة على الخطوات الآتية:

- تحضير العينة وتجفيفها.
- غمر العينة بمحلول ليشمان (0.15 غ ملون ليشمان + 100 مل كحول إيتيلي)، الممدد في الماء المقطر بنسبة (2:1) لمدة 10 دقائق، ومن ثم غسيلها بالماء المقطر بعناية لمدة دقيقة.
- تجفيف الصفيحة بورق الترشيح وفحصها مجهرياً باستخدام العدسة الغاطسة.

6- تلوين الأبواغ الداخلية Endospore stain :

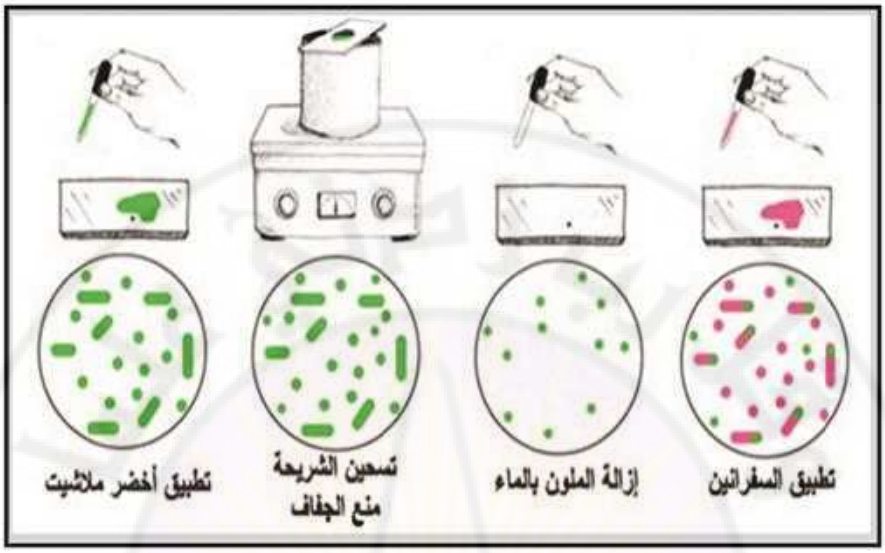
تمتلك بعض أنواع الجراثيم (كعصيات الأنتراكس *B. anthracis* والمطثيات *Clostridium tetani, C. botulinium, C. perfringens*) القدرة على إنتاج أشكال حية مقاومة دائرية أو بيضوية الشكل تُعرف بالأبواغ الداخلية التي يختلف حجمها (أصغر أو أكبر من الخلية الأم) ومكان توضعها (مركزية أو قرب انتهائية أو قمية) تبعاً

لنوع الخلية الجرثومية. وتحدث عملية التبوغ في ظروف التجويع (عند نقصان النتروجين خاصة) وتشتمل على سلسلة معقدة من المراحل التي تستغرق 15 ساعة تقريباً، وتنتهي بتشكيل بوغة واحدة قادرة على البقاء حية فترة طويلة من الزمن حتى تصبح شروط الوسط المحيط مناسبة للنمو (تعطي كل بوغة عند انتاشها خلية حية واحدة). تتميز الأبواغ بقدرتها على مقاومة التسخين والجفاف والأشعة والمطهرات الكيميائية والصادات الحيوية.

تُلون الأبواغ باستعمال إمّا ملون ملاشيت Malachite stain (الشكل 68) أو ملون الفوكسين الفحمي Carbol-Fuchsin وفي كلتا الحالتين يتم تسخين العينة لتسهيل مرور الملون إلى داخلها.

التلوين بأخضر ملاشيت Malachite green:

- أخذ عزلة جرثومية نقية من وسط الاستنبات بواسطة أداة معقمة وتمريرها ثلاث مرات في قطرة الماء المقطر (الموجودة على صفيحة زجاجية) للحصول على قطرة عكرة.
- فرش القطرة الناتجة على كامل سطح الصفيحة وتركها لتجف بالهواء ومن ثم تثبيتها بالتسخين.
- تغطية العينة بورقة ترشيح (حجم سائرة زجاجية) مشبعة بملون أخضر ملاشيت لمدة دقيقة.
- تسخين الصفيحة بعناية (لمدة 5 أو 6 دقائق) حتى يبدأ الملون بالتبخر عندها تُضاف كمية أخرى من الملون من حين إلى آخر لمنع جفاف ورقة الترشيح أثناء التسخين.
- ترك الصفيحة لتبرد ومن ثمّ تُغسل بالماء لمدة 30 ثانية.
- غمر العينة بعد تجفيفها نسبياً بمحلول السفرانين لمدة تتراوح بين 60 و 90 ثانية.
- غسيل الصفيحة بالماء 5 ثواني ومن ثمّ تجفيفها تمهيداً لدراستها تحت المجهر باستعمال العدسة الغاطسة (تتلون الأبواغ الحرة والداخلية باللون الأخضر والخلية الجرثومية بالأحمر الفاتح).



الشكل 68: مراحل التلوين بأخضر ملاشيت

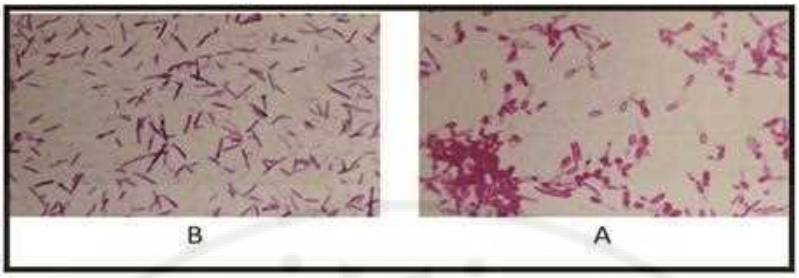
التلوين بالفوكسين الفحمي Carbol–Fuchsin:

بعد تحضير العينة وتثبيتها كما ورد سابقاً، يتم غمرها بالفوكسين الفحمي مع التسخين لمدة 5 دقائق (أخذ الحيطة والحذر لمنع الغليان أو الجفاف)، ومن ثم غسلها بالماء بعناية لمدة 5 ثواني.

- غمر العينة بحمض الكبريت (0.5%) لمدة دقيقة، ثم غسيلها بالماء (تكرر هذه الخطوة مع سابقتها عدة مرات حتى ظهور اللون الزهري الفاتح أو اختفاء اللون).

- غمر العينة بأزرق الميتيلين لمدة دقيقتين.

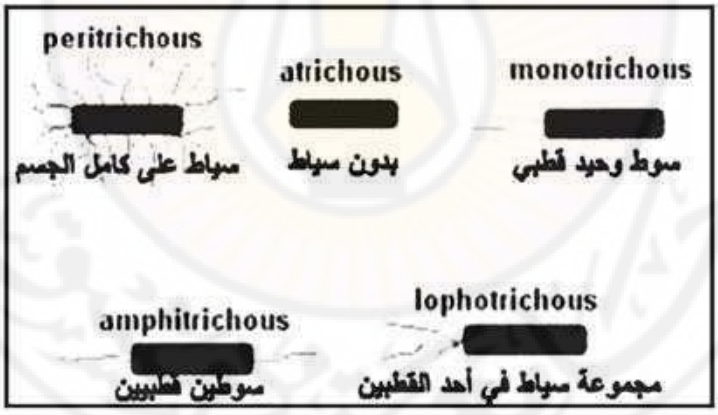
-غسيل الصفيحة بالماء وتجفيفها بورق الترشيح لفحصها مجهرياً (تتلون الخلية الجرثومية باللون الأزرق والأبواغ باللون الأحمر)، (الشكل 69).



الشكل 69: يبيّن الأبواغ وأماكن توضعها. (A) *Clostridium tetani*: البوغة انتهائية، (B) *Clostridium botulinum*: البوغة قرب انتهائية

7- تلوين السياط وملاحظة حركية الجراثيم:

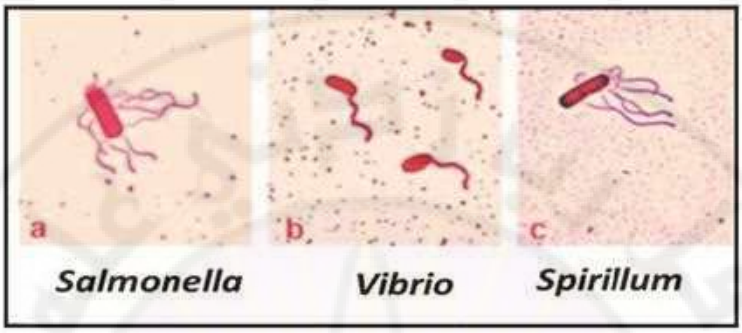
تستطيع أكثر الجراثيم الحركة بواسطة السياط. ويكون للسوط بنية نصف قاسية إسطوانية الشكل (يتراوح قطرها بين 10 و 30 نانومتر) تتركب من بروتين. تتغرس هذه البنية في جدار الخلية الجرثومية وفي غشائها السيتوبلاسمي عن طريق بنى تشبه القرص مسؤولة عن تحريك السوط عند دورانها.



الشكل 70: أنماط السياط على الخلايا الجرثومية

يساعد ظهور السياط وعددها وتوزعها على الخلية الجرثومية في عملية التصنيف والتمييز فهناك جراثيم بسوط وحيد قطبي التوضع وأخرى بسوطين قطبيي الوضع أو بأكثر من ذلك متوضعة في قطب أو في قطبين وقد تكون أحياناً منتشرة على كامل سطح الخلية (الشكل 70).

يُعرف العديد من الجراثيم المسببة للإنتانات الجرثومية تتحرك بفضل السياط كالسالمونيلا التيفية *Salmonella typhi*، وضمات الكوليرا *Vibrio cholera* وجراثيم *Spirillum* (الشكل 71).



الشكل 71: بعض أنواع الجراثيم المسوطة

تكون رؤية السياط بالمجهر الضوئي صعبة جداً لذلك لا بد من معالجتها بمواد خاصة (كحمض التانيك tannic acid أو كبريتات ألمنيوم البوتاسيوم) لتثبيت الملون. يستخدم في تلوين السياط أحد الملونات الآتية: الفوكسين القلوي (طريقة Gray) أو باراروزانيلين Pararosaniline (طريقة Leifson) أو نترات الفضة (طريقة west) أو بنفسجي كريستال (طريقة Difco). حيث تساهم هذه الملونات في تشكيل طبقة أو راسب على طول السوط لجعله مرئياً تحت المجهر.

طريقة West:

تعتمد هذه الطريقة على استعمال مثبت اللون (حمض التانيك أو كبريتات ألمنيوم البوتاسيوم) ونترات الفضة كملون. وتتضمن هذه الطريقة الخطوات الآتية:

- وضع 3 قطرات صغيرة من الماء المقطر على طرف صفيحة زجاجية نظيفة.
- مزج كمية ضئيلة من العينة (عزلة) مع قطرات الماء جيداً ومن ثمّ مد القطرة النهائية على كامل سطح الصفيحة.
- ترك العينة لمدة 15 دقيقة تقريباً لتجف في الهواء، ومن ثمّ غمرها بالمحلول المثبت لمدة 4 دقائق، لتُغسل بعدها بالماء المقطر لمدة 5 ثواني.

– وضع قطعة من ورق الترشيح (بحجم سانترة زجاجية) على الصفيحة وغمرها بمحلول نترات الفضة ومن ثم تسخين الصفيحة في حمام مائي (بالدرجة 100 مئوية) لمدة 5 دقائق (إضافة كمية من الملون من حين لآخر لمنع الجفاف).

– غسيل العينة مباشرة بالماء المقطر بعد إزالة ورقة الترشيح ومن ثمّ تركها مغمورة بالماء لمدة دقيقة (إذا لوحظت آثار من نترات الفضة على سطح الماء عندها تكرر عملية الغسيل مرة أخرى). أخيراً، تجفف العينة بالهواء وبدرجة حرارة الغرفة وتُفحص مجهرياً باستعمال العدسة الغاطسة.

طريقة Difco:

يتم فيها استعمال كاشف لوني للسياط جاهز (Difco test) وتشتمل الطريقة على المراحل الآتية:

– وضع قطرة من الماء على أحد طرفي صفيحة زجاجية (على بعد ا سم من الحافة).

– ملامسة أداة الاستنبات العقيمة الحاملة للعينة (العزلة) لقطرة الماء (عدم ملامسة الصفيحة) دون مزج.

– وضع الصفيحة بوضعية مائلة تسمح للقطرة بالانسياب إلى الحافة المقابلة.

– تجفيف العينة بالهواء الجاف وبدرجة حرارة الغرفة.

– معالجة العينة بالمثبت اللوني ومن ثم غمرها بمحلول بنفسجي كريستال لمدة 4 دقائق (يمكن أن تتراوح المدة بين 2 و 8 دقائق اعتماداً على عمر المستنبت والملون والحرارة).

– غسيل الصفيحة بالماء المقطر جيداً ومن ثمّ تركها بوضع شاقولي لتجف في الهواء الجاف وبدرجة حرارة الغرفة (أو استخدام مجفف الشرائح) تمهيداً لفحصها مجهرياً (تظهر الخلية الجرثومية مع السوط ملونة بالبنفسجي).

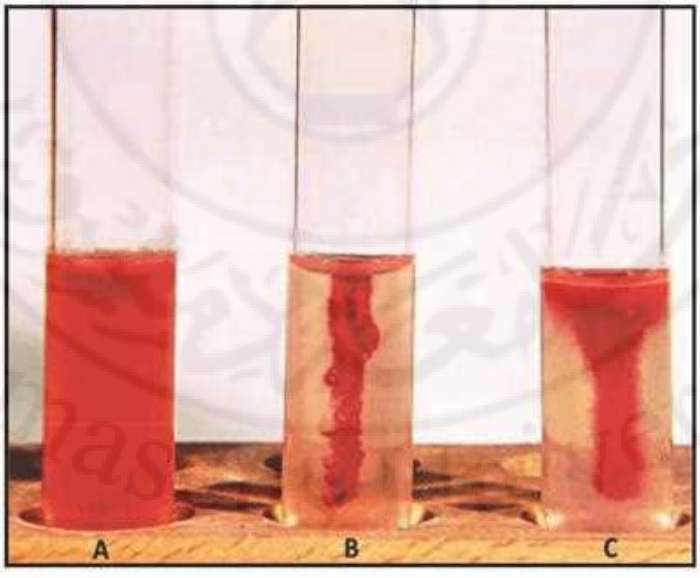
يُستعمل في اختبار حركية الجراثيم أنابيب تحوي وسط استنبات نصف صلب من الآغار (تركيز 0.3% للآغار لا يعيق الحركة). ويشتمل هذا الاختبار على تطبيق الخطوات الآتية:

- إدخال أداة عزل عقيمة حاملة للعزلة أو العينة، بشكل شاقولي في الأنبوب وباتجاه الأسفل.

- سحب أداة العزل بشكل شاقولي نحو الأعلى (من نفس مكان الدخول) مع أخذ الحيطة والحذر بعدم تحريك أو تدوير الأداة عند الإدخال أو السحب.

- حضن الأنبوب بالدرجة 37 مئوية. ومن ثمّ فحصه مجهرياً باستعمال الحقل المظلم dark field أو باستخدام phase contrast microscope.

فيما يتعلق بالجراثيم المتحركة يُلاحظ العكر منتشر في كل وسط الاستنبات بعيداً عن خط الإدخال عند نموها، في حين يبقى هذا العكر محصوراً عند خط الإدخال عند نمو الجراثيم الساكنة (الشكل 72).



الشكل 72: جراثيم متحركة (A – C)، جراثيم ساكنة (B).

التطبيق العملي

- التمييز بين أنواع جراثيم موجبة غرام وسالبة غرام بعد إجراء عملية التلوين، تدوين النتيجة مع الرسم.

- تمييز عصيات السل بعد إجراء عملية التلوين بطريقة زايل نلسون، تدوين النتيجة مع الرسم.

- التمييز بين أنواع الجراثيم المحاطة بمحفظة والجراثيم غير المحاطة بعد تطبيق إحدى طرق التلوين التي تم التنويه عنها في الأعلى. تدوين النتيجة مع الرسم.

- التمييز بين أنواع الجراثيم المتبوغة (تحديد مكان البوغة) والجراثيم غير المتبوغة بعد تطبيق إحدى طرق التلوين المشار اليها في الأعلى. تدوين النتيجة مع الرسم.

- التمييز بين الجراثيم المتحركة والجراثيم الساكنة من خلال الاستنبات على وسط نصف صلب من الآغار، تدوين النتيجة. فحص عينات الجراثيم المتحركة تحت المجهر بعد تلوينها، من أجل مشاهدة السياط وتحديد مكان توضعها مع الرسم.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الثالث

التفاعلات الحيوية الكيميائية Biochemical Reactions

(الاختبارات التفريقية Differential Tests)

على الرغم من أن آليات الاستقلاب عند الجراثيم معقدة، إلاّ أنها تسمح بالتمييز بين الكائنات الحية الدقيقة المستنبتة في الوسط الصنعي. حيث يمكن تمييز عدة أنواع من العوامل الممرضة من خلال تطبيق اختبارات حيوية كيميائية أو تفريقية مهمة لمجموعة جرثومية دون الأخرى.

تُخمر بعض أنواع الجراثيم الكربوهيدرات لتعطي مركبات حامضية أو غازية (الاثنين معا أحياناً). ويتم تمييز أنواع عديدة من الجراثيم اعتمادا على قدرتها على تفكيك أو عدم تفكيك الكربوهيدرات وعلى المركبات الناتجة عن حادثة التخمر. وتجدر الإشارة أيضاً إلى أنّ طبيعة المركبات الناتجة عن استقلاب الحموض الأمينية تعطي معلومات كافية للتمييز بين الأنواع الجرثومية.

كما تُعد الأنزيمات من الوسائط الكيميائية الهامة في تأمين نشاط الخلية الحية. تخرب الأنزيمات المواد محولة إياها إلى مركبات تستفيد منها الخلية في تركيب مكوناتها الخلوية أو في توليد الطاقة. ونظراً لأن الأنزيمات تسبب فقط تغيرات في المواد النوعية أو الركائز، لذلك يجب أن تكون كل خلية جرثومية مزودة بعدد من الأنزيمات المختلفة حيث يتوسط كل أنزيم آلية استقلابية معينة (اليورياز Urease يفكك البولة، والجيلاتيناز Gelatinase يفكك الجيلاتين).

تصنف هذه الأنزيمات بشكل عام إلى خارجية وداخلية. تُفرز الأنزيمات الخارجية من قبل الخلايا الجرثومية إلى الوسط المحيط لتحويل الجزيئات الغذائية الكبيرة إلى جزيئات صغيرة تستطيع الدخول إلى الخلية، حيث يستعمل قسم منها في إنتاج الطاقة (تستعمل في العديد من وظائف الخلية الجرثومية)، والقسم الآخر في تشكيل الجزيئات البنائية (تفيد في تركيب المكونات الخلوية)، عن طريق تدخل مجموعة الأنزيمات الداخلية. سيتم

استعراض عدد من الاختبارات الحيوية الكيميائية أو التفريقية التي تفيد في تمييز بعض الأنواع الجرثومية الممرضة وتصنيفها.

1- حلمهة النشاء (اختبار الأميلاز Amylase test):

النشاء عبارة عن عديد سكاكر (مؤلف من الأميلوز Amylose والأميلوبكتين Amylopectin) ناتج عن ارتباط عدة جزيئات سكرية بسيطة مع بعضها البعض، لتشكيل سلسلة طويلة ترتبط بدورها مع سلسلة أخرى وهكذا. عندما يضاف اليود إلى محلول النشاء يتشكل معقد (اليود – النشاء) يتميز بلونه البني الداكن / البنفسجي الغامق، في حين لا يظهر هذا اللون عندما يتحلمه النشاء إلى جزيئاته البسيطة من السكاكر (الديكسترين والمالتوز والغلوكوز).

تُستعمل هذه الخاصة (حلمهة النشاء) لتمييز بعض أنواع الجراثيم التي تمتلك القدرة على حلمهة النشاء، من خلال إفرازها لبعض الأنزيمات الخارجية exoenzymes كأنزيم Amylase-α القادرة على تفكيك النشاء إلى مجموعة من السكاكر البسيطة التي تدخل بسهولة إلى داخل الخلية الجرثومية.

التطبيق العملي

المواد المستعملة: أطباق بتري تحوي وسط آغار – نشاء، جراثيم (*E. coli, Bacillus subtilis*) مستنبتة على وسط Trypticase Soy Broth بعمر 24-48 ساعة، إبر تلقيح جرثومي مزودة بعقدة انتهائية.

الخطوات العملية:

- يتم وضع خط واضح في أسفل طبق الآغار (يقسم الطبق إلى قسمين يكتب على كل قسم اسم الجرثوم المستعمل).
- تؤخذ عزلة من مستنبت كل نوع جرثومي بإبرة التلقيح وتوضع في الجزء المخصص لها على طبق الآغار – النشاء، الذي يحضن فيما بعد بالدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة.
- يضاف إلى طبق البتري محلول الإيودين بوضعه على طول خط التلقيح لكل نوع جرثومي لمشاهدة النتيجة (الشكل 73).

النتيجة:

* ظهور منطقة نيّرة أو فاتحة حول الجراثيم النامية: دليل على افراز الجرثوم لأنزيم Amylase-α الذي يؤدي إلى حلمهة النشاء وتحويله إلى جزيئات بسيطة، وبالتالي عند إضافة محلول الإيودين لا يتشكل معقد الإيودين – النشاء ذو اللون البني الداكن.

* ظهور منطقة ملونة باللون البني الداكن حول منطقة نمو الجراثيم دليل على عدم احتواء هذه الجراثيم على أنزيم حلمهة النشاء، وبالتالي يتشكل معقد الإيودين – النشاء عند إضافة محلول الإيودين.

الشكل 73: يُبيّن ناتج حلمهة النشاء بعد إضافة الإيودين. (A) منطقة نيّرة حول جراثيم *B. subtilis*، (B) منطقة غامقة اللون حول جراثيم *E. coli*

2- اختبار الكواغولاز Coagulase test:

تمتلك بعض أنواع الجراثيم العنقودية (الممرضة خاصة) القدرة على انتاج أنزيم الكواغولاز Coagulase (بنوعيه المرتبط والحر) المسبب لتخثر الدم. ويتم تطبيق هذا الاختبار إما على صفيحة (لكشف الأنزيم المرتبط) أو في أنبوب (لكشف الأنزيم الحر) من أجل التمييز بين العنقوديات المذهبة *S. aureus* والعنقوديات الجلدية *S. epidermidis*.

التطبيق العملي

المواد المستعملة: صفائح زجاجية نظيفة – أنابيب زجاجية نظيفة – مستعمرات جرثومية للعنقوديات بعمر 24 – 48 ساعة – إبرة تلقيح ذات عقدة انتهائية – مصل أرنب مضاف إليه السيترات citrate (لمنع التخثر الذاتي)

الخطوات العملية:

* اختبار الكواغولاز على صفيحة:

– عمل حلقة بقطر 2.5 سم تقريباً على صفيحة نظيفة.

– وضع قطرتين من بلاسما الأرنب (إما بواسطة عود خشبي أو بأداة التلقيح العقيمة) داخل الحلقة، ومن ثم وضع مستعمرة جرثومية مفردة.

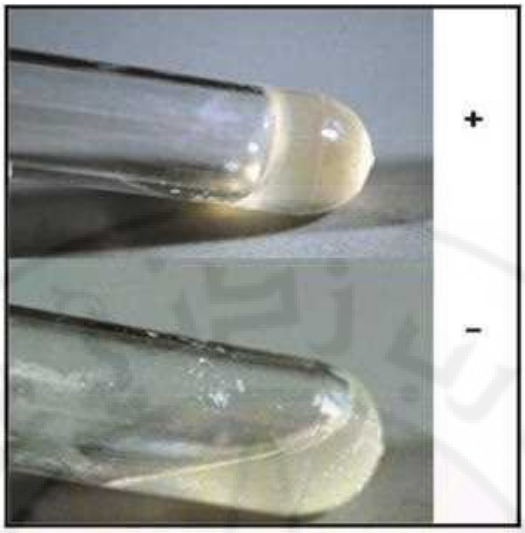
– بعد المزج جيداً، تُشاهد نتيجة الاختبار المتمثلة بتشكل خثرة واضحة خلال 10 – 15 ثانية.

* اختبار الكواغولاز في أنبوب:

– إضافة عزلة جرثومية بابرة التلقيح إلى أنبوب يحوي بلاسما أرنب (0.5 مل)

– بعد المزج الجيد يُحضن الأنبوب بالدرجة 37 مئوية.

– يُفحص الأنبوب (بوضعية مائلة) بعد 30 دقيقة ثم بعد كل ساعة (تُعطي بعض السلالات نتيجة إيجابية بعد عدة ساعات من بدء الاختبار). تُعد أي درجة تخثر نتيجة إيجابية لأنزيم الكواغولاز بشكله الحر.



الشكل 74: تفاعل الكواغولاز في أنبوب. حدوث تخثر في الأنبوب العلوي (+).

3- حلمهة البولة (اختبار اليورياز Urease test):

تمتلك بعض أنواع الجراثيم القدرة على تفكيك البولة إلى الأمونيا (النشادر) وثاني أكسيد الكربون والماء بسبب انتاجها لكميات كبيرة من أنزيم البولة Urease. وللكشف عن هذه الخاصة، تستنبت الجراثيم المراد فحصها على وسط يحوي البولة (كركيزة أنزيمية) وأحمر الفينول (كمشعر لوني). حيث تستطيع الجراثيم المنتجة لأنزيم اليورياز تفكيك البولة إلى النشادر وثاني أكسيد الكربون والماء مما يؤدي إلى تغير لون الوسط من البرتقالي إلى الزهر الغامق (بسبب زيادة درجة قلوية الوسط إلى أكثر من 8 وذلك بعد الحضن لمدة تتراوح بين 4 و 8 ساعات قد تمتد إلى 24 ساعة).

التطبيق العملي

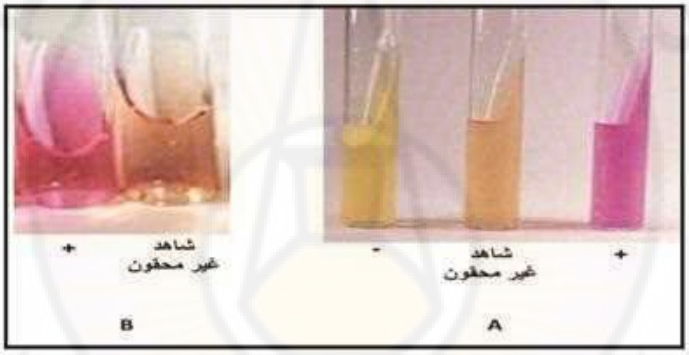
المواد المستعملة: أنابيب تحوي وسط معقم (درجة حموضته 6.9) إما سائل (مؤلف من مرق وبولة وأحمر الفينول) أو صلب بشكل مائل (مؤلف من آغار وبولة ومشعر لوني) – كائنات حية دقيقة (*E. coli, Klebsiella pneumonia* or *Proteus vulgaris*) مستنبتة على وسط Trypticase Soy Broth بعمر 24-48 ساعة، إبر تلقيح جرثومي مزودة بعقدة انتهائية.

الخطوات العملية:

تُدخل مستعمرة جرثومية واحدة لكل نوع جرثومي في أنبوب يحوي إما وسطاً سائلاً أو وسطاً صلباً (يكتب على كل أنبوب اسم الجرثوم)، ومن ثمّ تُحضن الأنابيب فيما بعد بالدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة.

النتيجة:

* تحول لون الوسط إلى اللون الزهري الغامق بسبب زيادة قلوية الوسط دليل على إيجابية التفاعل.
* بقاء لون الوسط برتقالي دليل على سلبية الاختبار.



الشكل 75: يُبيّن نتيجة اختبار اليورياز على وسط الآغار (A) و وسط المرق (B) المضاف لكليهما البولة والمشعر اللوني

4- اختبار الكتلاز Catalase test:

يفكك أنزيم الكتلاز catalase الموجود عند الجراثيم الهوائية والهوائية المخيرة، الماء الأكسجيني H_2O_2 إلى ماء H_2O وغاز الأكسجين O_2 (الذي يظهر على شكل فقاعات غازية) وبالتالي فهو مسؤول عن إزالة السمية من الخلية الجرثومية. يفيد هذا الأنزيم أيضاً في التمييز من جهة بين الجراثيم موجبة غرام (العنقوديات *Staphylococcus* والعقديات *Streptococcus*) ومن جهة أخرى بين الجراثيم سالبة غرام (النيسيريا *Neisseria* و الـ *Hemophilus*).

يمكن إجراء هذا الاختبار إما على مستنبت جرثومي (عن طريق إضافة قطرة من الماء الأكسجيني مباشرة إلى طبق بتري الحاوي على الجرثوم) أو على عزلة صغيرة مأخوذة من المستعمرة الجرثومية المراد تحديد نوعها (بوضعها فوق قطرة من الماء الأكسجيني (3%) الموجودة على صفيحة زجاجية نظيفة). إذا كانت الجراثيم المفحوصة قادرة على إنتاج أنزيم الكتلاز عندها يتفكك الماء الأكسجيني إلى الماء وغاز الأكسجين الذي يظهر على شكل فقاعات غازية.

ولا بد من الإشارة إلى أن هذا الاختبار لا يُطبق على مستنبتات من الآغار المدمى لأن الكريات الحمر تحوي هذا الأنزيم.

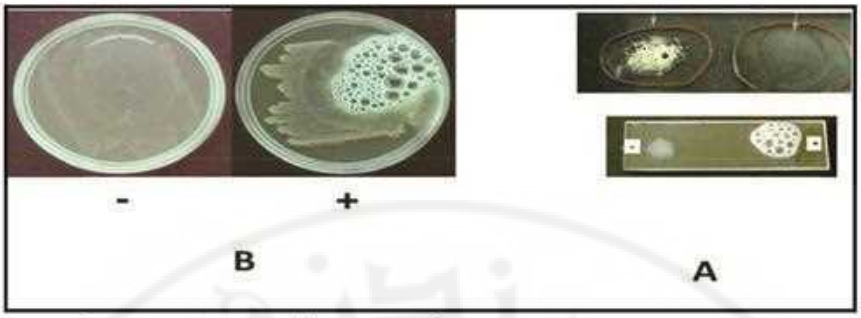
المواد المستعملة: صفائح مجهرية نظيفة، ماء أوكسيجيني (3-4%)، مستنبتات لجراثيم: *Streptococcus*, *Staphylococcus* بعمر 24-48 ساعة، إبر تلقيح جرثومي مزودة بعقدة انتهائية.

الخطوات العملية:

- وضع عزلة صغيرة من المستعمرة الجرثومية مأخوذة بابرة التلقيح على الصفيحة الزجاجية النظيفة (صفيحة لكل مستعمرة)
- وضع قطرة من الماء الأكسيجيني فوقها ومن ثم قراءة النتيجة.

النتيجة:

* ظهور الفقاعات الغازية دليل على إيجابية الاختبار وبالتالي وجود أنزيم الكتلاز عند الجرثوم (أنواع جنس *Staphylococcus*، وجراثيم *Neisseria*)
* عدم ظهور الفقاعات دليل على سلبية الاختبار (أنواع جنس *Streptococcus*، جراثيم *Hemophilus*).



الشكل 76: اختبار الكتلاز: تشكل الفقاعات الغازية (على الصفيحة أو المستنبت) دليل إيجابية التفاعل

5- اختبار الأكسيداز Oxidase test:

يفيد اختبار الأكسيداز (الأنزيم التنفسي cytochrome c oxidase في سلسلة نقل الإلكترون) في التمييز بين عائلتي: Pseudomonadaceae (ox+) و Enterobacteriaceae (ox-). يُستعمل في هذا الاختبار مشعر أو كاشف عديم اللون يكشف عن وجود هذا الأنزيم ويتفاعل مع الأكسجين ليصبح ملوناً.

التطبيق العملي

المواد المستعملة: زراعات جرثومية فتية (عمر المستنبت أقل من 24 ساعة) مستنبتة على الآغار كاشف Tetramethyl-p-phenylenediamine- إبرة تلقيح ذات عقدة انتهائية- ورق ترشيح.

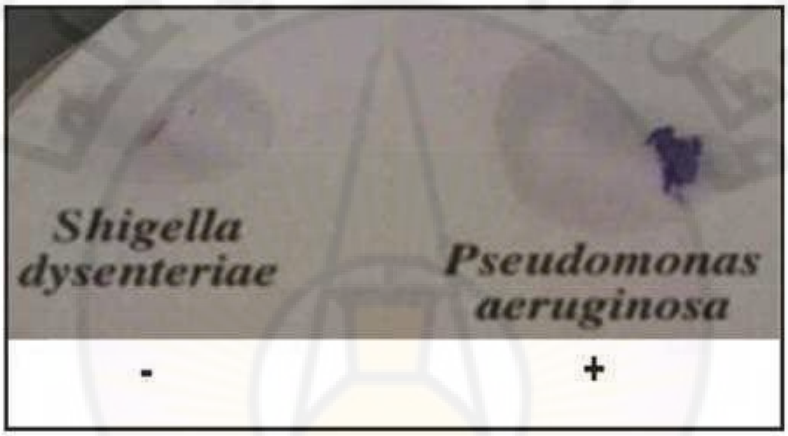
الخطوات العملية:

- وضع عزلة (أو جزء) من المستنبت الجرثومي بإبرة التلقيح على قطعة ورق ترشيح
- وضع قطرة من الكاشف Tetramethyl-p-phenylenediamine فوقها، تمهيداً لقراءة النتيجة.

النتيجة: يكون زمن التفاعل الإيجابي 20 ثانية تقريباً (عادة بين 10 و 15 ثانية)، يظهر في بداية التفاعل لون أزرق بنفسجي يتحول فيما بعد إلى بنفسجي واضح (الشكل 77). مع التنويه إلى عدم قراءة نتيجة الاختبار بعد مضي 30 ثانية (لعدم ثبات الكاشف المستعمل).

كمـا يمكـن إجـراء هـذا الاختبـار بوضـع قـرص مشـرب بكاشـف الأكسـيداز (p-aminodimethylaniline) على صفيحة مجهرية (أو في مركز ورقة ترشيح رطبة) و ترطيبه بعدة قطرات من الماء. يُنشر على القرص فيما بعد المستعمرة الجرثومية المراد فحصها (نيسيريا *Neisseria* أو زوائف *Pseudomonas*).

إذا كانت الجراثيم منتجة لأنزيم الأكسيداز، فإن اللون حول القرص يتحول مباشرة إلى اللون البنفسجي، في حين لا يحدث أي تبدل لوني إذا كانت الجراثيم غير منتجة لهذا الأنزيم.



الشكل 77: اختبار الأكسيداز: ظهور اللون الأزرق دليل على ايجابية التفاعل عند جراثيم الزوائف

6- حلمهة الكازئين Casein hydrolysis test:

تمتلك بعض الأنواع الجرثومية المنتجة لأنزيم caseinases الخارجي القدرة على حلمهة بروتين الكازئيين (المسؤول عن إعطاء الحليب لونه المعروف) وتحويله إلى مركبات أكثر انحلالاً.

التطبيق العملي

المواد المستعملة: وسط آغار – حليب خالي الدسم، جراثيم (*E. coli, Bacillus subtilis*) مستنبتة على وسط Trypticase Soy Broth بعمر 24-48 ساعة، إبر تلقيح جرثومي مزودة بعقدة انتهائية.

الخطوات العملية:

- يتم وضع خط واضح في أسفل طبق الآغار (يقسم الطبق إلى قسمين يكتب على كل قسم اسم الجرثوم المستعمل).
- تؤخذ عزلة من مستنبت كل نوع بكتيري وتوضع في الجزء المخصص لها على طبق الآغار – حليب خالي الدسم، الذي يحضن فيما بعد بالدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة.

الشكل 78: حلمهة بروتين الكازئين. (A) منطقة شفافة حول مستعمرة جراثيم *B. subtilis*، (B) بقاء الوسط أبيض اللون عاتم المظهر حول مستعمرة جراثيم *E. coli*

النتيجة:

* ظهور منطقة نيّرة أو شفافة خالية من الحليب حول الجراثيم النامية (تُلاحظ بسهولة عند وضع الطبق على سطح داكن) دليل على حلمهة بروتين الكازئين (الشكل 78: A).

* بقاء اللون الأبيض والمظهر الداكن لوسط الآغار – حليب خالي الدسم حول المستعمرة الجرثومية النامية دليل على عدم الحلمهة (الشكل 78: B).

7-حلمهة الجيلاتين Gelatin hydrolysis test:

يساهم هذا الاختبار في تحديد الأنواع الجرثومية وتصنيفها. حيث تستطيع بعض الأنواع الجرثومية، المنتجة لأنزيم البروتياز Protease أو الجيلاتيناز Gelatinase ، أن تميع الجيلاتين (بروتين حيواني يغزر وجوده في النسج الواصلة) حتى في درجات الحرارة

المنخفضة، في حين لا تستطيع أنواع أخرى حلمهة الجيلاتين وبالتالي بقاء الهلام صلبا حتى في درجات حرارة أدنى من 25 درجة مئوية.

التطبيق العملي

المواد المستعملة: وسط الجيلاتين المعقم (أطباق بتري أو أنابيب)، جراثيم (*E. coli*, *Bacillus subtilis*) مستنبتة على وسط Trypticase Soy Broth بعمر 24-48 ساعة، إبر تلقيح جرثومي مزودة بعقدة انتهائية.

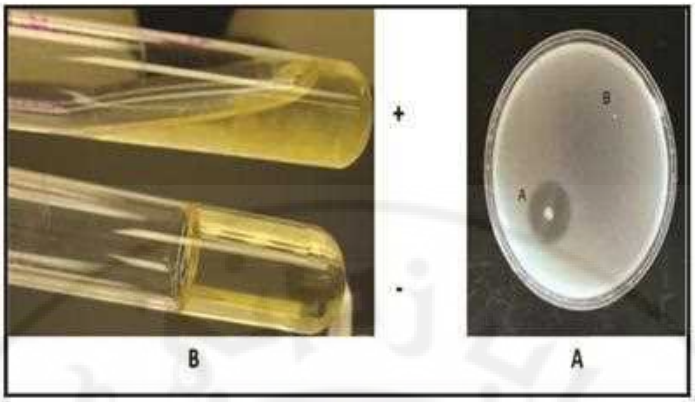
الخطوات العملية:

- تلقح أطباق بتري، (بعد كتابة اسم الجرثوم المستعمل على أسفل كل طبق)، بطريقة التخطيط والأنابيب (بعد كتابة اسم الجرثوم المستعمل على كل أنبوب)، بطريقة الوخز بالجراثيم المراد اختبارها.
- تُحضن الأطباق والأنابيب فيما بعد بالدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح بين يوم و عدة أيام.

النتيجة:

* الأطباق: ظهور منطقة شفافة أو نيّرة حول المستعمرة الجرثومية دليل على إيجابية الاختبار وحلمهة الجيلاتين (الشكل 79: A). تشاهد هذه النتيجة بعد غمر وسط الاستنبات الجيلاتيني بمحلول كبريتات الأمونيوم (3 – 5%) لمدة 5 دقائق ومن ثمّ إزالته.

* الأنابيب: بقاء وسط الاستنبات الجيلاتيني سائلاً بعد وضع الأنابيب في الثلاجة دليل على قدرة الخلايا الجرثومية على إنتاج الأنزيم الحال للجيلاتين. في حين أن تجمد هذا الوسط دليل على عدم قدرة الجراثيم على حل هذا البروتين (الشكل 79: B).



الشكل 79: حلمهة الجيلاتين في الأطباق (A) وفي الأنابيب (B)

8- اختبار الإندول Indole test:

يمتلك عدد قليل من الجراثيم القدرة على إنتاج أنزيم التريبتوفناز tryptophanase الذي يفكك حمض التريبتوفان إلى حمض البيروفيك والنشادر والإندول.

يُستعمل لهذا الاختبار وسط الببتون المائي العادي أو الغني بالتريبتوفان وكاشف Ehrlich-Kovacs (paradimethylaminobenzaldehyde) الذي يأخذ اللون الأحمر عند تشكل الإندول في المستنبت.

التطبيق العملي:

المواد المستعملة: أنابيب تحوي وسط الببتون المائي المعقم، مستنبتات لجراثيم: *E. coli, Salmonella* على وسط Trypticase Soy Broth بعمر 24-48 ساعة، إبر تلقيح جرثومي مزودة بعقدة انتهائية، كاشف Ehrlich-Kovacs.

الخطوات العملية:

- تلقح الأنابيب (بعد كتابة اسم الجرثوم المستعمل على كل أنبوب)، بالجراثيم المراد اختبارها و تحضن بالدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح بين 24 و 72 ساعة.
- وضع من 2 إلى 6 قطرات من كاشف Ehrlich-Kovacs في كل أنبوب.

النتيجة:

ظهور حلقة من اللون الأحمر على سطح الأنبوب دليل على إيجابية الاختبار وتشكل الإندول.

9- اختبار الكشف عن غاز كبريت الهيدروجين H_2S:

تمتلك بعض الأنواع الجرثومية القدرة على تفكيك الحموض الأمينية الكبريتية (كالميتيونين أوالسيستئين) وإنتاج غاز كبريت الهيدروجين H_2S. يُستعمل لإجراء هذا الاختبار أوساط تحوي أملاحاً معدنية (مثل كبريتات الحديد أو خلات الرصاص) و مصدراً كبريتياً (كالحمض الأميني الميتيونين) ليتشكل كبريت المعدن من خلال ارتباط غاز الكبريت (الناتج عن استقلاب أثناء نمو الكائنات الدقيقة) مع ملح المعدن (مثل كبريت الحديد أسود اللون).

التطبيق العملي

المواد المستعملة: أطباق بتري تحوي وسط S.S (*Salmonella-Shigella*) ، مستنبتات لجراثيم: *Salmonella*, *E. coli* بعمر 24-48 ساعة، إبر تلقيح جرثومي ذات عقدة قمية.

الخطوات العملية:

- تلقح أطباق بتري (بعد كتابة اسم الجرثوم المستعمل على كل طبق) بالجراثيم المراد اختبارها بطريقة التخطيط.
- تحضن الأطباق (بشكل مقلوب) فيما بعد بالدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح بين 24 و 48 ساعة.

النتيجة:

ظهور اللون الأسود دلالة على إيجابية الاختبار المتمثلة بقدرة جراثيم الـ *Salmonella* على إنتاج غاز الكبريت.

10- اختبار الكشف عن الحركية Motility test:

يفيد وسط SIM نصف الصلب (المؤلف من الآغار ومصدر للكبريت والتريبتوفان وملح الحديد) في الكشف من جهة عن الإندول Indole و/أو غاز كبريت الهيدروجين H_2S ومن جهة أخرى عن حركية Motility النوع الجرثومي المستنبت.

التطبيق العملي

يمكن إجراء الاختبارات الثلاث "الإندول و كبريت الهيدروجين والحركية" في أنبوب واحد إلاّ أن تشكل غاز كبريت الهيدروجين يعيق رؤية الحركية أحياناً. لذلك يتم اجراء هذا التطبيق في أنابيب مختلفة.

المواد المستعملة: أنابيب تحوي وسط SIM، مستعمرات جرثومية: *E. coli*, *Enterobacter*، إبر عقيمة ذات عقدة انتهائية.

الخطوات العملية:

- تلقح الأنابيب (بعد كتابة اسم الجرثوم المستعمل على كل أنبوب)، بالجراثيم المراد اختبارها وتحضن بالدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح ما بين 24 ساعة.

النتيجة:

* تغير لون الوسط إلى اللون الأسود دليل على إنتاج غاز كبريت الهيدروجين وتشكل كبريت الحديد (الشكل 80: A)

* تغير لون كاشف Ehrlich-Kovacs (الذي يضاف إلى المستنبت SIM بمعدل 2 إلى 6 قطرات، ويترك في وضع الراحة لمدة دقيقة) من الأصفر إلى الأحمر (حلقة حمراء اللون) دليل على إنتاج الإندول في الوسط (الشكل 80: B).

أما بالنسبة للكشف عن حركية بعض الأنواع الجرثومية (الشكل 80: C) فيتم:

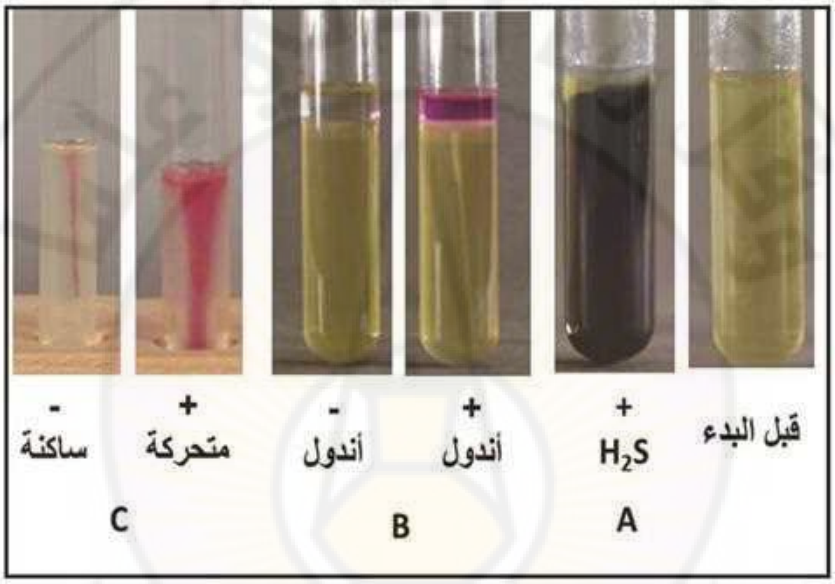
- غرس إبرة التلقيح الحاملة للجرثوم بشكل شاقولي (مستقيم) وباتجاه الأسفل في أنبوب حاوي على المستنبت SIM
- سحب الإبرة من نفس المكان بشكل مستقيم نحو الأعلى

- فحص الأنبوب عند خط دخول وخروج الإبرة لملاحظة الحركية.

النتيجة:

* نمو الكائنات المتحركة بعيداً عن خط دخول وخروج الإبرة والذي يترافق بتشكل عكارة تمتد على كامل المستنبت في الأنبوب.

* نمو الكائنات غير المتحركة عند خط الإدخال فقط.



الشكل 80: وسط SIM قبل بدء الاختبار. (A) اللون الأسود (وجود H_2S)، (B) اللون الأحمر (وجود الإندول)، لون الوسط طبيعي (عدم وجود الإندول)، (C) النمو بعيداً عن خط الإدخال (جراثيم متحركة)، النمو عند خط الإدخال (جراثيم ساكنة)

11- اختبار تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation test:

تعتبر الكربوهيدرات مواد معقدة كيميائياً تتخمر بتدخل أنزيمات الأحياء الدقيقة، لتشكل نواتج (حمض فقط أو حمض وغاز) تُستعمل كمنبع للطاقة. يُعد اختبار الكربوهيدرات أو السكاكر من الاختبارات التشخيصية المهمة والمفيدة في التمييز ليس فقط بين الأنواع المخمرة وغير المخمرة للسكاكر، وإنما بين الأنواع المخمرة لنوع واحد أو أكثر من السكاكر والمنتجة إما لحمض فقط أو لحمض وغاز في آن واحد. يكون الغاز الناتج عن عملية التخمر CO_2 و H_2 (الشكل 80: C,B,A).

التطبيق العملي

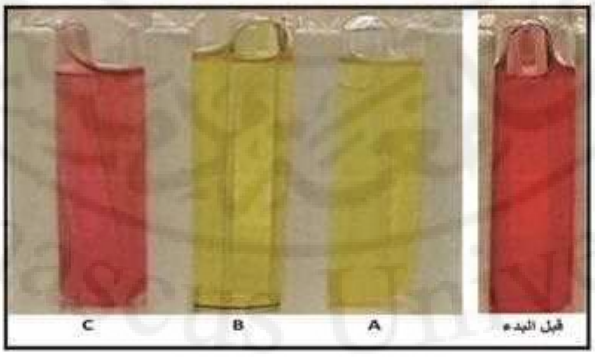
المواد المستعملة: أنابيب تحوي وسط المرق المغذي أو الببتون المائي المضاف إليه أحد انواع السكاكر (غلوكوز، مالتوز، سكروز، لاكتوز...)، والمشعر اللوني (أحمر الفينول)، وأنبوب صغير مقلوب Durham's tube – جراثيم (*Bacillus sabtilis* *Staphylococcus aureus*, *E. coli*) مستنبتة على Trypticase Soy agar – إبر تلقيح ذات عقدة انتهائية.

الخطوات العملية:

- كتابة اسم الجرثوم على أنبوب الاختبار وتحديد نوع السكر الموجود فيه.
- تلقيح كل أنبوب (أنبوب فيه نوع واحد من السكاكر) بنوع واحد من الجراثيم المدروسة.
- تُحضن الأنابيب بالدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة.

النتيجة:

* تبدل لوني للوسط (من الأحمر إلى الأصفر) دون ظهور فقاعات غازية في أنبوب درهام (حدوث تخمر للسكر وتشكل حمض فقط، الشكل 81: B).
* تبدل لوني للوسط (من الأحمر إلى الأصفر) مع ظهور فقاعات غازية متجمعة في أنبوب درهام المقلوب (حدوث تخمر للسكر وتشكل ناتج حمضي وغاز، الشكل 81: A).
* عدم حدوث أي تبدل لوني أو انطلاق غاز (دليل على سلبية التفاعل وعدم حدوث تخمر، الشكل 81: C).



الشكل 81: اختبار تخمر الكربوهيدرات: وسط المرق وانبوب Durham قبل إضافة الجراثيم، (A) تبدل لوني للوسط وظهور فقاعات غازية متجمعة في أنبوب Durham، (B) تبدل لوني للوسط فقط دون ظهور فقاعات غازية، (C) عدم تغير لون الوسط وعدم ظهور فقاعات غازية.

التطبيق العملي

التمييز بين أنواع الجراثيم من خلال تطبيق التفاعلات الكيميائية المذكورة أعلاه.
تدوين النتيجة الخاصة بكل نوع جرثومي مستعمل في كل تفاعل مع تعليل النتيجة.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الباب الثالث

التشخيص المناعي المصلي للأخماج

Immuno-sero diagnosis of the infections

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الأول

الاختبارات المصلية

Serological Tests

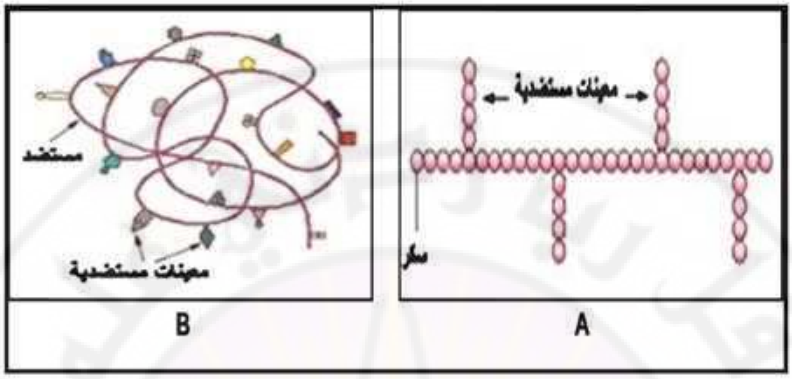
تشير الاستجابة المناعية المكتسبة acquired immunity إلى قدرة جسم الكائن الحي نوعياً على تمييز العوامل الغريبة (المستضدات) التي تدخل إليه. وهي تشتمل على استجابة مناعية خلطية humoral immune response (تتمثل بإنتاج الأجسام الضدية عن طريق تدخل اللمفاويات البائية والتائية كرد فعل على العنصر أو العامل الغريب)، واستجابة مناعية خلوية الوساطة cell-mediated immunity response (تتضمن إنتاج الخلايا القاتلة الطبيعية activated natural killer cells المنشطة والبلاعم المفعلة activated phagocytes، وكذلك اللمفاويات التائية السامة cytotoxic T cell بتدخل اللمفاويات التائية المساعدة T helper cell كرد فعل على وجود عنصر أو عامل غريب).

ترتبط قطع أو أجزاء من المستضد antigen، تُعرف باسم المعينة المستضدية epitope، مع الجسم الضدي ومستقبلاتها الموجودة على سطح اللمفاويات البائية (BCRs) والتائية (TCRs).

تكون المعينة المستضدية إما بروتين مرتفع الوزن الجزيئي (البروتينات السكرية والشحمية والنووية)، أو عديد سكاكر (مثل عديد السكاكر الشحمي lipopolysaccharid).

توجد هذه الجزيئات على سطح الفيروسات والخلايا بما فيها الجراثيم والفطريات ووحيدات الخلية والخلايا البشرية أيضاً. تتميز مستضدات عديد السكاكر (عدة جزيئات سكرية) بأنها تحوي معينات مستضدية (من 3 إلى 4 ثمالات سكر) متشابهة (اشكل 82: A)، في حين تمتلك المستضدات البروتينية، معينات مستضدية عديدة (من 5 إلى 15 ثمالة حمض أميني) مختلفة النوعية (بسبب أن البروتين مؤلف من سلسلة بروتينية تحوي

مئات من الحموض الأمينية، التي تُعطي للبروتين بنية ثلاثية الأبعاد) تساهم في توليد استجابة مناعية قوية (الشكل82: B).



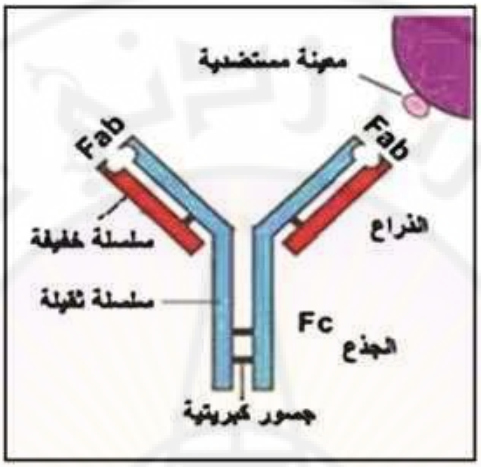
الشكل 82: يُبيّن نوعية المعينات المستضدية في عديد السكاكر (A) وفي البروتين (B)

نظراً لأن السطح الخارجي للخلية الجرثومية يتألف من بروتينات مختلفة وعديد سكاكر، فإن الاستجابات المناعية الناتجة تكون موجهة ضد المعينات المستضدية المتعددة (البروتينات السكرية) الموجودة في غلاف الخلية الجرثومية.

وتجدر الإشارة إلى أن كل جزء من بنية العامل الممرض (جدار الخلية والمحفظة والسياط واللسينات والكابسيدات والبروتينات السكرية الغلافية إضافة إلى الذيفانات الخارجية) يؤدي دور المستضد. كما أن هناك عوامل أخرى تلعب دور مستضدات يتعرف عليها جسم الكائن الحي كعناصر غريبة عنه (منها: غبار المنزل وغبار الطلع والشعر وسم النحل والطعام والأدوية والطعوم والخلايا السرطانية والمخموجة وخلايا أمراض المناعة الذاتية).

أما الأجسام الضدية antibodies فهي عبارة عن جزيئات بروتينية نوعية (غلوبولينات مناعية immunoglobulins)، تفرز في بلاسما الدم من قبل الخلايا البلازمية المتمايزة تجاه مستضد معين، ويُعرف للأضداد عدة صفوف هي: IgE, IgD, IgA, IgM, IgG.

تتميز الصفوف IgE, IgD, IgG ببساطة بنيتها، فهي أحادية القسيم (γ) مؤلفة من أربع سلاسل من البروتينات السكرية (الشكل 83): سلسلتين ثقيلتين متماثلتين ذات وزن جزيئي مرتفع (تختلف من صف لآخر) وسلسلتين خفيفتين متبدلتين ذات وزن جزيئي منخفض.



الشكل 83: يُبيّن بنية الجسم الضدي

ترتبط السلاسل ببعضها البعض بواسطة جسور ثنائية الكبريت وروابط غير تكافؤية. ويحوي الجزيء على منطقة العنق، التي تسمح للجسم الضدي بالارتباط بمعينتين مستضديتين متباعدتين على سطح العامل الغريب، بسبب ليونتها وسهولة حركتها. تكون منطقة الذراع (سلسلتين خفيفة وثقيلة) في الجسم الضدي شديدة التبدل ومسؤولة عن ربط المعينة المستضدية نوعياً، في حين تكون منطقة الجذع (سلسلتين ثقيلتين) مسؤولة عن التفاعلات الحيوية كتنشيط بروتينات المتممة (صفي IgG, IgM) أو الارتباط بالبلاعم (IgG, IgA) أو الأسسات Basophils والخلايا البدينة Mast cells (IgE)، في حين يتميز الصفّان IgM, IgA ببنية معقدة، حيث يكون الأول خماسي القسيم والثاني ثنائي القسيم.

تُعد الاختبارات المناعية مفيدة في الكشف عن الكائنات الحية الطفيلية الخامجة خاصة بالنسبة للكائنات صعبة العزل؛ لأنها تعتمد الكشف عن الارتباط بين المستضد والضد النوعي له، يُطبق في معظم المختبرات بعض التفاعلات المصلية من أجل:

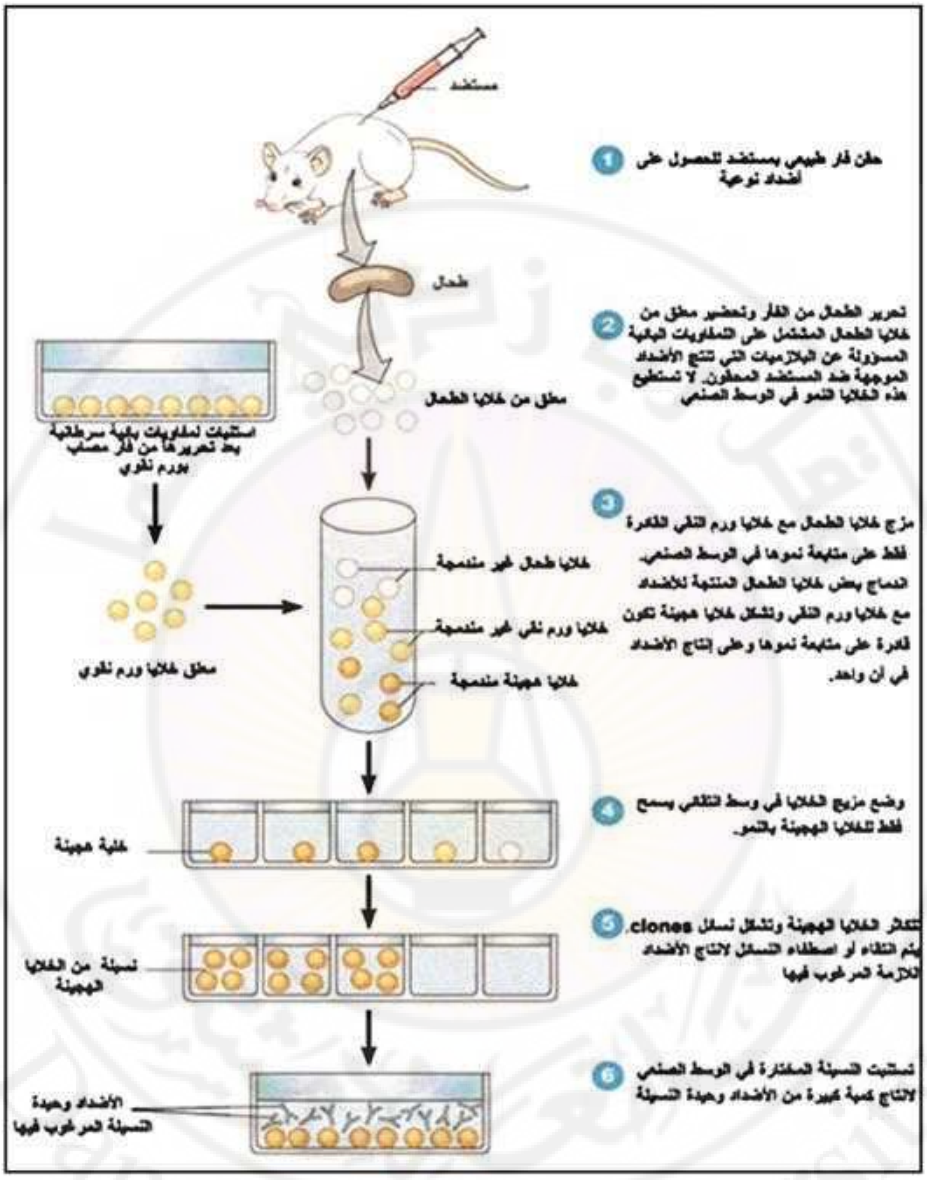
- **تمييز المستضدات** المجهولة العائدة للعامل الممرض في العينات المرضية، وهي اختبارات مباشرة direct tests يُستعمل فيها أجسام ضدية معروفة موجهة ضد مستضد مجهول محدد.
- **كشف الأضداد** الناتجة عن الاستجابة المناعية تجاه مستضد نوعي، في مصل المصاب.

وهي اختبارات غير مباشرة indirect tests تعتمد استعمال مستضد محدد ومعروف يفيد في الكشف عن الأضداد النوعية له في العينة المصلية المفحوصة.

أولاً: التشخيص المصلي

1- تحضير الأضداد antibodies preparation

يتم تحضيرها عن طريق إما حقن الحيوانات بمستضد نوعي معروف (سلالة معروفة من الجراثيم) لتحريض جهازها المناعي على إنتاج الأضداد النوعية تجاه هذا المستضد في المصل الذي يتم الحصول عليه بعد قتل الحيوانات المحقونة، أو الخلايا الهجينة للحصول على الأضداد وحيدة النسيلة الأكثر استعمالاً في الأبحاث الطبية والتشخيص المصلي وعلاج بعض أنواع السرطانات وغيرها. حيث يتم تحضير الأضداد وحيدة النسيلة تبعاً للخطوات الواردة في الشكل 84:



الشكل 84: يُبيّن خطوات تحضير الأضداد وحيدة النسيلة

2- انتباج المحفظة (تفاعل كويللنغ Quelling reaction)

يفيد هذا الاختبار المباشر، الذي يعتمد على مشاهدة انتباج المحفظة مجهريا عند معالجة العضيات (المثبتة على صفيحة زجاجية) بمصل يحوي أضداد نوعية ضد

المحفظة، في التعرف على العديد من الجراثيم (التي تمتلك محفظة) في العينات المرضية حيث تترسب الأضداد النوعية على محيط المحفظة التي تظهر بشكل منتفخ عاكس للإضاءة. يُطبّق تفاعل كويللنغ على كافة الأنماط المصلية لجراثيم العقديات الرئوية *S. pneumoniae* والمستدميات النزلية (النمط B) *H. influenzae* والنيسيريا السحائية *N. meningitis* (النمطين A – C).

3- اختبارات التراص Agglutination tests

يُطبّق اختبار التراص المباشر لتحديد نوع الكائن الحي الدقيق الممرض أو المستضد باستعمال أضداد معلومة مرتبطة بجزيئات كبيرة الحجم غير منحلة (مثل اللاتكس latex أو كريات الدم الحمراء).

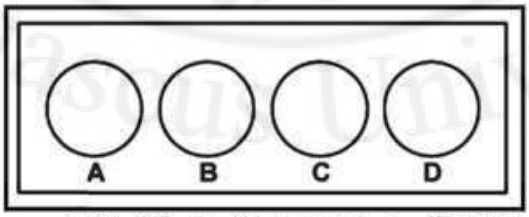
فبعد مزج المستضد المجهول مع الجزيئات المعلمة بالضد النوعي المعلوم، تُقرأ نتيجة الاختبار التي تكون إيجابية عند مشاهدة التحوصب أو التكتل (وجود المستضد وارتباطه النوعي بالضد) مرئياً بالعين المجردة، وسلبية عند بقاء المزيج متجانس (عدم وجود المستضد النوعي في العينة المفحوصة وبقاء الجزيئات المعلمة بالأضداد حرة).

* التنميط المصلي لجراثيم الشغيلا *Shigella*:

تُعرف لجراثيم الشغيلا أنواع مصلية مختلفة هي: *Sh. dysenteriae, Sh. flexneri, Sh. boydii, Sh sonnei*. يُستعمل للكشف عن جراثيم الشيغلا المشكوك فيها (كمستضد مجهول) مصل يحوي أضداد نوعية موجهة ضد المستضد الجداري "O" لكل نوع من الأنواع الأربعة.

خطوات العمل:

- تعليم الدوائر الموجود على الصفيحة الزجاجية بـ D, C, B, A (الشكل 85).

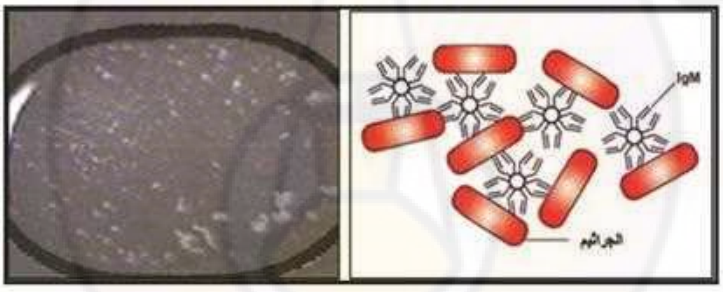


الشكل 85: يبيّن شكل الصفيحة المستخدمة في التفاعل

- إضافة قطرة من جراثيم الشغيلا المشكوك بها (المستضد المجهول) المعالجة بالفورمالين (منعاً لحدوث أي تلوث أو عدوى) إلى كل دائرة.
- إضافة قطرة من المصل الضدي المعلوم إلى كل دائرة (أضداد ضد الشغيلا تحت مجموعة A إلى الدائرة A – أضداد ضد الشغيلا تحت مجموعة B إلى الدائرة B – أضداد ضد الشغيلا تحت مجموعة C إلى الدائرة C – أضداد ضد الشغيلا تحت مجموعة D إلى الدائرة D).
- إجراء المزج بعناية وبحركة دائرية لمدة تتراوح بين 30 و 60 ثانية.

قراءة النتيجة:

ملاحظة التحوصب بالعين المجردة في إحدى الدوائر دليل على وجود جراثيم الشغيلا المتوافقة مع الضد النوعي المستعمل، وبالتالي إيجابية الاختبار (الشكل 86).



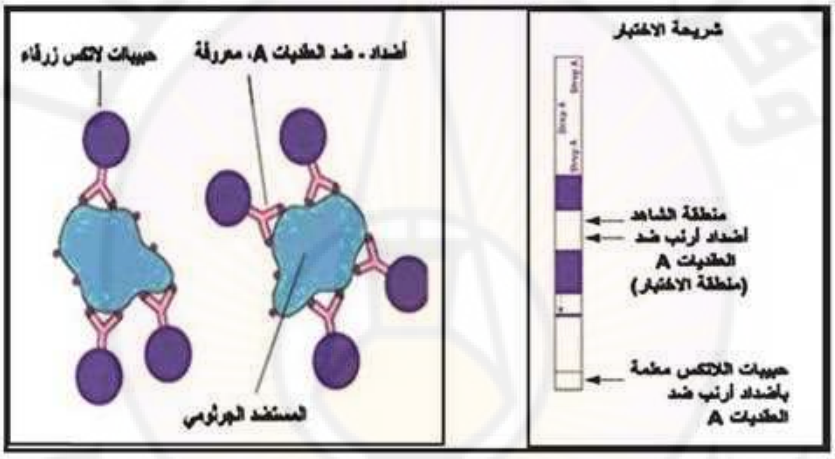
الشكل 86: يُبيّن نتيجة اختبار التراص للكشف عن جراثيم الشغيلا

* التنميط المصلي لجراثيم العقديات *Streptococcus*

يُعد اختبار OSOM المستعمل في تشخيص التهاب البلعوم العقدي الذي تسببه جراثيم العقديات *S. pyogenes* (المجموعة A) اختباراً مصلياً نوعياً للكشف عن مستضد العقديات A في المسحة البلعومية. ويشتمل الاختبار على المراحل الآتية:

- وضع محلول استخلاص العينة (يتألف من: 3 قطرات من نتريت الصوديوم "5 M" و 3 قطرات من حمض الليمون "0.03 M") في أنبوب اختبار.
- وضع المسحة البلعومية (الأداة المعقمة الحاوية في نهايتها القطنية على العينة) بعد أخذها من المصاب، في الأنبوب وتحريكها دائرياً لمدة دقيقة ومن ثم ضغطها للحصول على أكبر كمية من العينة.

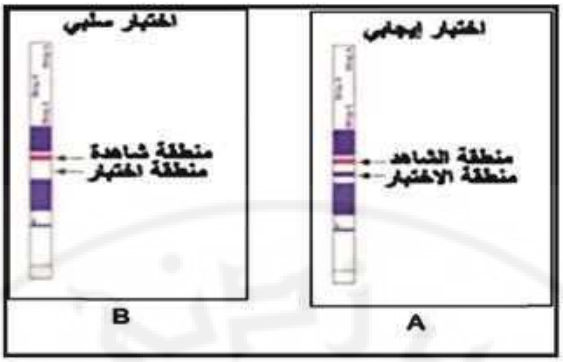
- تغطيس شريحة الاختبار (بعد إزالة المسحة) في الأنبوب تبعاً لاتجاه السهم (الشكل 87) وتركها لمدة 5 دقائق. يبدأ مستضد العقديات مجموعة A (المستخلص من *S. pyogenes* الموجودة في مسحة بلعومية لشخص يعاني من التهاب بلعومي عقدي) بالهجرة نحو الأعلى بخاصة الاستشراب ليتفاعل مع الأضداد المحمولة على جزيئات اللاتكس الزرقاء (الموجودة في قاعدة الشريحة) مشكلاً معقداً (مستضد العقديات A – ضد) يستمر بالهجرة حتى الوصول إلى منطقة خط الاختبار حيث توجد أضداد العقديات A – ضد الأرنب (المسؤولة عن إيقاف التفاعل).



الشكل 87: يُبيّن طبيعة الشرائح المستخدمة في اختبار العقديات

قراءة النتيجة:

إذا كانت العينة حاوية على المستضد تكون النتيجة إيجابية (تشاهد عصابة زرقاء اللون ناتجة عن تشكل المعقد: مستضد العقديات A – الأضداد المحمولة على جزيئات اللاتكس عند منطقة خط الاختبار إضافة إلى تشكل عصابة حمراء اللون عند منطقة الخط الشاهد دليل على انتهاء الاختبار). في حين تكون النتيجة سلبية عند غياب المستضد حيث تتشكل عصابة الخط الشاهد فقط (الشكل 88: B,A).

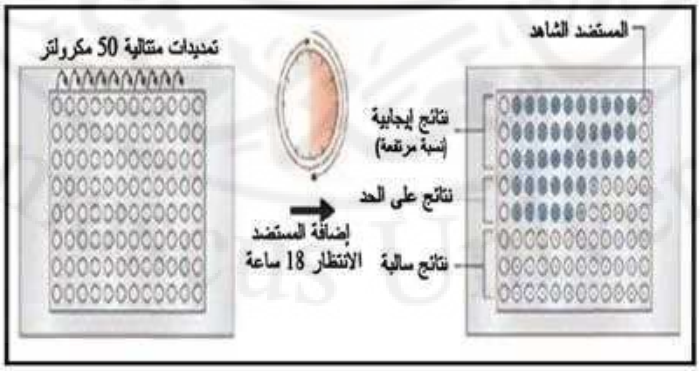


الشكل 88: يُبيّن ايجابية اختبار التراص وسلبيته عند الكشف عن المستضد A للعقديات

كما يتم تطبيق اختبار التراص أيضاً للكشف عن الإصابة بجراثيم السالمونيلا *Salmonella*، حيث يحدث التراص الذي يُرى بالعين المجردة نتيجة وجود جراثيم السالمونيلا (في قطرة معلق الخلايا المفحوصة) التي ترتبط مع الأضداد النوعية (في قطرة مأخوذة من المصول المضادة للمستضدات "O" الموجودة في جدار الخلية الجرثومية أو من المصول المضادة للمستضد السوطي "H").

* الكشف عن الإصابة بداء الليشمانية الحشوي

يتم هذا الاختبار بإجراء تمديدات تسلسلية للعينة المصلية المفحوصة في محلول ملحي (0.9%) في صفائح متعددة الآبار، كما هو مبين في الشكل 89. ومن ثمّ إضافة حجم مماثل من المحلول المستضدي في كل بئر. تُحضن الصفائح (بعد المزج جيداً) بدرجة حرارة الغرفة لمدة 18 ساعة تمهيداً لمشاهدة وقراءة النتيجة (الشكل 89).



الشكل 89: يُبيّن التمديدات المتتالية ونتائج الاختبار

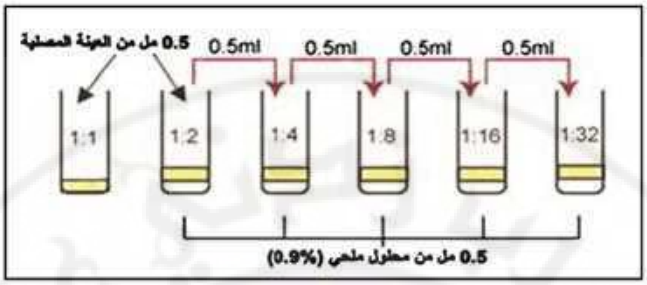
كما يُطبق اختبار التراص غير المباشر (الذي يطبق على صفيحة أو في أنبوب) في الكشف عن الضد في العينة المفحوصة بشكل غير مباشر عن طريق إما استعمال جزيئات كبيرة الحجم وغير منحلة (كاللاتكس أو كريات الدم الحمراء)، معلمة بمستضد معروف أو باستعمال خلاصة العامل الممرض المنحلة.

* الكشف عن الداء الإفرنجي syphilis

يطبق اختبار التراص للكشف عن الإصابة بداء الإفرنجي syphilis (الذي تسببه جراثيم اللولبيات الشاحبة *Treponema pallidum*) من خلال تحري وجود الأضداد في مصل المصاب.

بشكل عام عند حدوث العدوى بهذه الجراثيم يتشكل في مصل المصاب أضداد موجهة ضد الليبيدات غير نوعية (تعرف باسم reagin)، لا تشاهد على الإطلاق في مصل الشخص السليم. يعتقد بأن الجرثوم يسبب تخريب خلايا نسج المضيف مؤدياً إلى تحرر المواد الشحمية التي ترتبط بدورها مع بروتين من الجرثوم ليتشكل مستضد يحرض جسم المصاب على إنتاج أضداد غير نوعية (أو nontreponemal) موجهة ضد ليبيدات نسج الجسم وأضداد نوعية (أو treponemal) موجهة ضد بروتين الجرثوم ذاته. للكشف عن الأضداد غير النوعية يطبق اختبار: RPR (rapid plasma reagin)test، الذي يُستعمل فيه مستضد محدد (مؤلف من: الكارديوليبين cardiolipin والليسيتين lecithin و الكوليسترول) محمول على جزيئات charcoal وذلك لجعل ناتج التفاعل يُرى بالعين المجردة. حيث يشاهد تحوصب جزيئات charcoal بسبب وجود الأضداد غير النوعية (الموجهة ضد الليبيدات) في العينة المصلية المفحوصة التي ترتبط مع المستضدات الشحمية المعروفة المحمولة على سطح هذه الجزيئات، كما يمكن تحديد تركيز الأضداد في العينة المصلية عن طريق عمل تمديدات متسلسلة للعينة المصلية المفحوصة في محلول ملحي (0.9%) وتطبيق اختبار RPR باستخدام المستضد السابق تبعاً للخطوات الآتية:

- إجراء تمديدات متسلسلة للعينة المصلية المفحوصة كما هو مبين في الشكل 90، ليتم التخلص من 0.5 مل من الأنبوب الأخير (1:32).



الشكل 90: يبين التمديدات التسلسلية للعينة المصلية

- بواسطة ماصة شعرية تؤخذ قطرة من كل تمديد وتوضع على الدوائر الموجودة على صفيحة اختبار RPR وفرشها جيداً داخل الدائرة (الانتباه إلى استعمال ماصة جديدة لكل تمديد).
- بواسطة ماصة توضع قطرة من المستضد المعروف فوق كل عينة ممددة (الانتباه لعدم ملامسة الماصة للعينة المصلية) وتمزج جيداً مع العينة المصلية بواسطة عود بلاستيكي.
- توضع الصفيحة على جهاز هزاز وتحرك بحركة دورانية لمدة 4 دقائق، لتقرأ بعدها نتيجة التفاعل كما هو وارد في الجدول المرافق:

1:32	1:16	1:8	1:4	1:2	1:1
سلبي	سلبي	سلبي	إيجابي	إيجابي	إيجابي

ظهور تراص واضح لجزيئات charcoal يعني إيجابية التفاعل، عدم تشكل أي تحوصب يشير إلى سلبية التفاعل، وتكون نسبة التمديد الأعلى للعينة المصلية القادرة على إحداث التراص هي عيار أو تركيز الضد في تلك العينة.

* الكشف عن الإصابة بالحمى المعوية Enteric fever

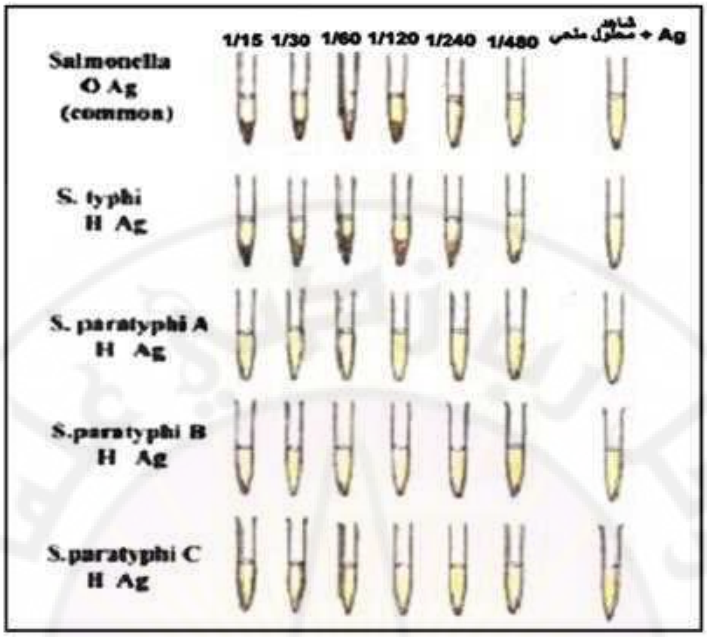
تُعد جراثيم السالمونيلا (*Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*) مسؤولة عن إصابة الإنسان بهذا الداء. ويتم الكشف عنها بتطبيق اختبار التراص أو ما يعرف باختبار فيدال Widal test عن طريق الكشف عن الأضداد المتشكلة كرد فعل مناعي

تجاه الإصابة بمستضدات هذه الجراثيم (أهمها: المستضد الجسمي "O" الشائع عند كلا النوعين من الجراثيم، والمستضد السوطي "H" الذي يفيد في تمييز أنواع السالمونيلا *Salmonella*: *S. typhi*؛ *S. paratyphi* "A,B,C"، يجري التفاعل على النحو الآتي:

توضع كمية (20 ميكروليتر) من العينة المصلية المفحوصة في حجرة على صفيحة خاصة بهذا الاختبار (يعتمد عدد الحجرات على عدد المستضدات المستخدمة) ومن ثمّ يُضاف إليها كمية (40 ميكروليتر) من الكاشف المستضدي (محاليل تحوي جزيئات اللاتكس المعلمة بالمستضد) بعد مزجه جيداً، ثمّ توضع الصفيحة بعد إجراء المزج بواسطة عود بلاستيكي، على جهاز هزاز لمدة 3 دقائق لقراءة النتيجة ومقارنتها مع شاهد إيجابي وآخر سلبي، حيث تكون النتيجة إيجابية عندما يحدث التراص (في حال وجود الأضداد في العينة المصلية) ويشاهد بالعين المجردة.

يُطبّق اختبار التراص في الأنبوب من أجل تحديد تركيز الأضداد في العينة المصلية عن طريق عمل تمديدات تسلسلية للعينة المصلية المفحوصة في محلول ملحي (0.9%) واستعمال المستضدات المعروفة (المستضد الجسمي O الشائع عند السالمونيلا، المستضد السوطي H لنوع *S. typhi*، المستضد السوطي H لنوع "A" *S. paratyphi*، المستضد السوطي H لنوع "B" *S. paratyphi*، المستضد السوطي H لنوع "C" *S. paratyphi*) تبعاً للخطوات الآتية:

- إجراء تمديدات متسلسلة للعينة المصلية المفحوصة في أنابيب مخروطية صغيرة موزعة في خمس مجموعات (كل مجموعة مؤلفة من ستة أنابيب) وهناك أنبوب شاهد يضاف إلى كل مجموعة يحوي فقط محلول ملحي (0.9 %)، (الشكل 91).



الشكل 91: يُبيّن التمديدات التسلسلية للعينة المصلية

- إضافة حجم ثابت من المستضدات (نوع مستضدي للصف الواحد). يوضع في الأنبوب نفس الحجم من النوع المستضدي.

- بعد المزج جيداً تُحضن الأنابيب بالدرجة 37 مئوية لمدة 4 – 6 ساعات، لتقرأ فيما بعد نتيجة التفاعل: التي تكون إيجابية عند حدوث تراص بين الأضداد الموجودة في العينة المصلية والمستضد الجسمي O وكذلك بين الأضداد وواحد من المستضدات السوطية H (الذي يشير إلى أن النوع *S. typhi* هو المسؤول عن الإصابة بالحمى المعوية)، وتكون نسبة التمديد الأعلى للعينة المصلية القادرة على إعطاء تفاعل إيجابي (حدوث تراص) هي تركيز الأضداد في تلك العينة (1:120).

* الكشف عن الإصابة بالحمى المالطية Malta fever:

تسبب جراثيم البروسيلا *Brucella* الإصابة بالحمى المالطية (Malta fever/ Melitnsis) التي يتم تشخيصها عن طريق تطبيق اختبار التراص في الأنبوب، باستعمال محلول متجانس من جراثيم البروسيلا كمستضد معروف:

- إجراء تمديدات متسلسلة للعينة المصلية المفحوصة (1:20، 1:40، 1:80، 1:160، 1:320) في أنابيب.

- إضافة حجم مماثل من المحلول المستضدي لكل الأنابيب.

- حضن الأنابيب (بعد المزج جيداً) بالدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح بين 2 و 4 ساعات تمهيداً لقراءة النتيجة التي تكون إيجابية عند مشاهدة التحوصب أو التراص في الأنابيب، ويكون أعلى تمديد للعينة المصلية المفحوصة (الذي يعطي تفاعلاً إيجابياً)، هو تركيز الأضداد في تلك العينة (1:320). يكون الشاهد المستعمل في هذا الاختبار مؤلفاً فقط من المستضد والمحلول الملحي.

وهناك اختبار يُعرف باسم التراص المساعد Co-agglutination الذي يُطبق سلالات العنقوديات المذهبة *Staphylococcus aureus* التي تمتلك على سطحها الخارجي البروتين A الذي يرتبط بالضد النوعي في منطقة الجذع Fc. ويفيد في الكشف من جهة عن سلالات العقديات الحالة للدم β ومن جهة أخرى عن المستضدات خارج الخلوية في العينة المرضية (المستدميات النزلية "b" *H. influenzae* أو النيسيريا السحائية *N. meningitidis* أو العقديات الرئوية *S. pneumoniae*).

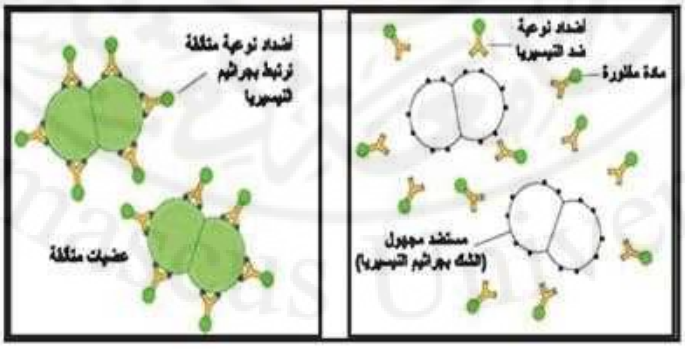
4- اختبارات التألق المناعي immunofluorescence tests

يُطبق اختبار التألق المباشر للكشف عن مستضد مجهول في العينة المفحوصة (كالمستضدات السطحية في جراثيم العقديات واللولبيات، أو المستضدات الموجودة في المصل والسائل الدماغي الشوكي وداخل الخلايا في المقاطع النسيجية وفي عينات أخرى) باستعمال أضداد نوعية مرتبطة بمادة مفلورة أو متألقة (إيزو تيوسيانات المفلورة) ومجهر التألق المناعي (الشكل 92).

الشكل 92: يُبيّن مراحل تطبيق اختبار التألق المناعي

* الكشف عن جراثيم النيسيريا *Neisseria gonorrhoeae*

بعد تثبيت المستضد المجهول (العينة المشكوك بأنها تحوي جراثيم النيسيريا) على الصفيحة المجهرية، يُضاف إليه ضد معروف معلم بمادة مفلورة، وبعد الحضن تُغسل الصفيحة بالدارئة تمهيداً لفحصها بمجهر التألق المناعي. تكون نتيجة الاختبار إيجابية عند مشاهدة الومضان بسبب تشكل المعقد مستضد – ضد نوعي متألق (أي العينة تحوي جراثيم النيسيريا)، و سلبية عند انعدام التألق بسبب زوال الأضداد المفلورة أثناء الغسيل لعدم وجود مستضد نوعي ترتبط إليه (الشكل 93).



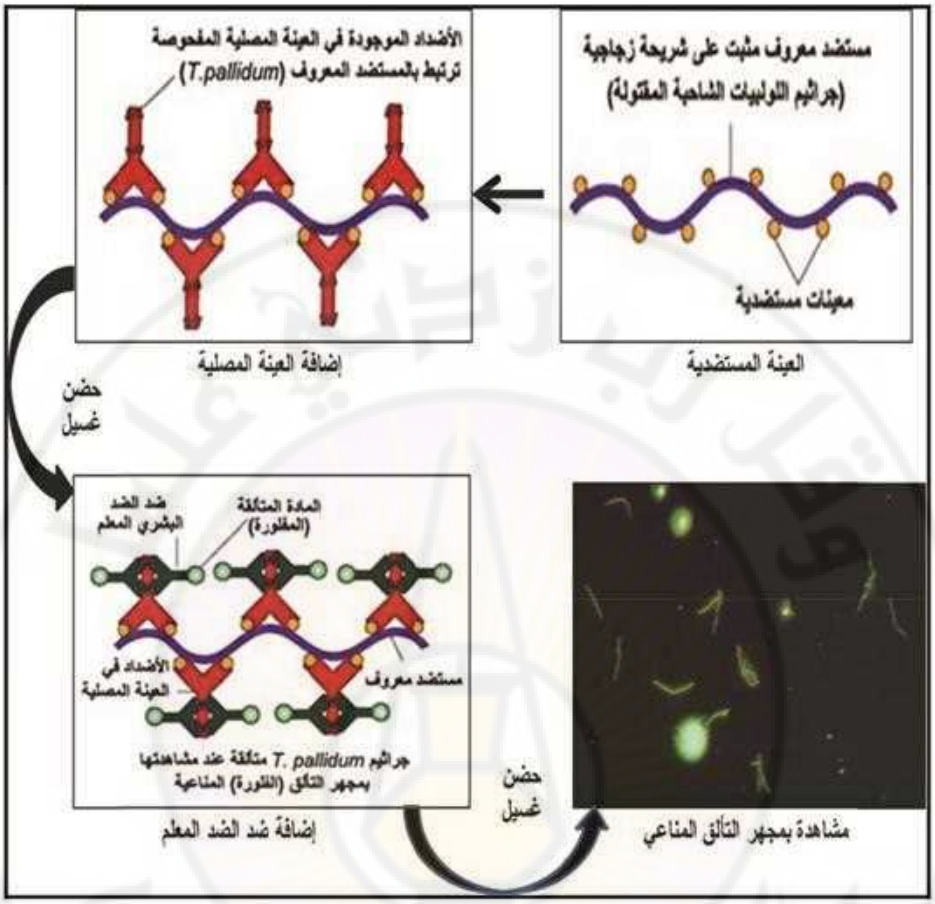
الشكل 93: اختبار التألق المناعي: ارتباط الضد النوعي المتألق مع المستضد (جراثيم النيسيريا)

كما يُطبق اختبار التألق غير المباشر للكشف عن الأضداد في العينة المصلية المفحوصة باستعمال مستضد محدد (للعامل الممرض) وأضداد ثانوية معلمة بمادة متألقة أو مفلورة، ويبين الشكل 94 مراحل تطبيق هذا الاختبار.

الشكل 94: مراحل تطبيق اختبار التألق المناعي غير المباشر

* الكشف التأكيدي للإصابة بالداء الإفرنجي Syphilis

يُستعمل اختبار Indirect Fluorescent Treponemal Antibody absorption (FTA-ABS) Test لتأكيد الإصابة بالداء الإفرنجي syphilis، لأنه يكشف نوعياً عن الأضداد التي تُفرز في مصل المصاب كرد فعل مناعي على إصابته بجراثيم اللولبيات الشاحبة *T. pallidum*. يتم تطبيق هذا الاختبار باستعمال جراثيم اللولبيات الميتة (كمستضد معروف) تبعاً للخطوات الواردة في الشكل 95:



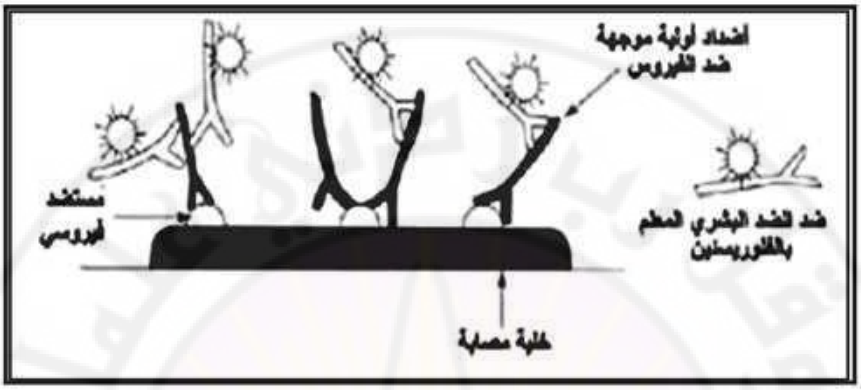
الشكل 95: يُبيّن مراحل اختبار التألق المناعي غير المباشر للكشف عن الإصابة بداء الإفرنجي

إذا احتوت العينة المصلية على الأضداد النوعية لجراثيم اللولبيات، فإن هذه الأضداد سترتبط بالمستضدات المثبتة على الصفيحة لتشكيل معقد (مستضد – ضد) يرتبط بدوره بضد الضد المعلم مؤدياً لظهور ومضان يشاهد بواسطة مجهر التألق، وتكون النتيجة إيجابية.

* تشخيص الإصابة بداء الحصبة

يسبب هذا الداء فيروس الحصبة virus *Measles*، ويتم تشخيصه عن طريق الكشف عن الأضداد في العينة المصلية المفحوصة بتطبيق اختبار التألق (الشكل 96) الذي تؤدي فيه الخلايا المصابة بالفيروس المثبط دور المستضد المعلوم المثبت على

شريحة اختبار. تستكمل في هذا الاختبار جميع الخطوات المتبعة في تشخيص الداء الإفرنجي.

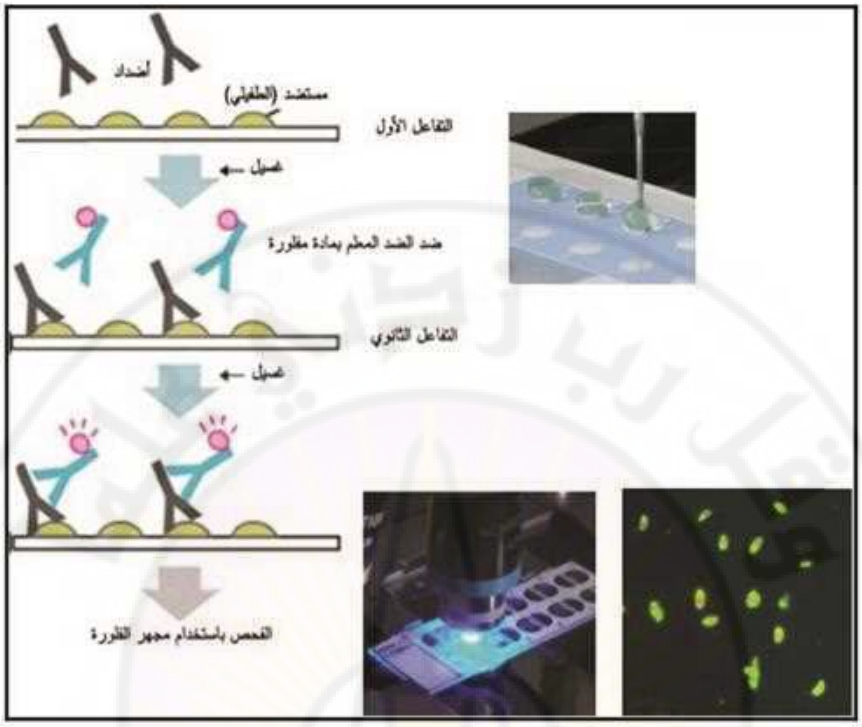


الشكل 96: يُبيّن مراحل اختبار التألق في الكشف عن الإصابة بفيروس الحصبة

تكون نتيجة الاختبار إيجابية عند مشاهدة الومضان (خلايا مخموجة متألقة) بسبب حدوث الارتباط النوعي بين الأضداد الموجودة في العينة المصلية والمستضد المثبت على صفيحة الاختبار وتشكيل معقد (مستضد – ضد) يرتبط بدوره مع ضد الضد المعلّم بالفلوريسئين.

* تشخيص الإصابة بداء التوكسوبلاسما Toxoplasmosis

يُسبب هذا الداء طفيلي المقوسات القندية *Toxoplasma gondii*، ويتم تشخيصه عن طريق الكشف عن الأضداد (IgG أو IgM) في العينة المصلية المفحوصة بتطبيق اختبار التألق الذي يؤدي فيه الطفيلي دور المستضد المعلوم المثبت على شريحة اختبار. تستكمل في هذا الاختبار جميع الخطوات المبينة في الشكل 97.



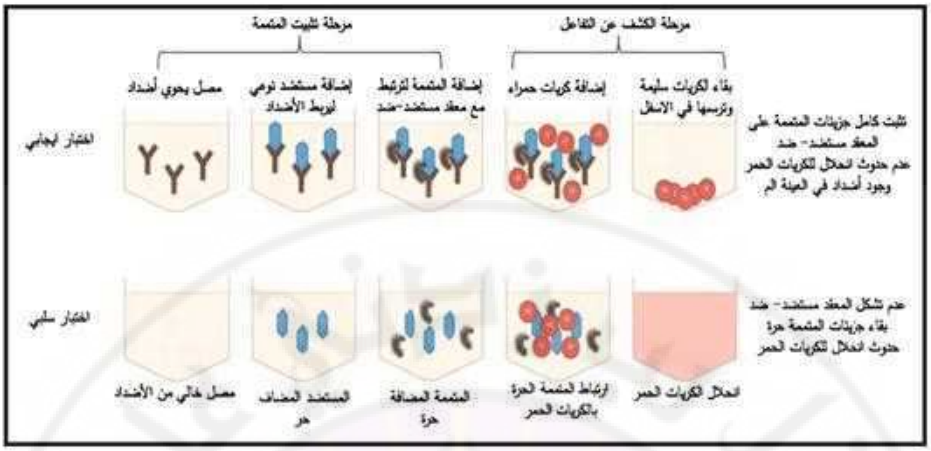
الشكل 97: يُبيّن مراحل اختبار التألق في الكشف عن الإصابة بطفيلي التوكسوبلاسما

تكون نتيجة الاختبار إيجابية عند مشاهدة الومضان (خلايا الطفيلي متألقة) بسبب حدوث الارتباط النوعي بين الأضداد الموجودة في العينة المصلية المفحوصة والمستضد.

5- تثبيت المتممة Complement fixation

تتألف جملة المتممة الموجودة في بلاسما (مصل) الدم من 20 بروتين تقريباً. تتفاعل هذه البروتينات مع بعضها ومع الأغشية الخلوية بعد تفعيل كل عنصر من عناصرها ضمن ظروف مناسبة ليستمر التفاعل. ومن بين العوامل المفعلة تشكل المعقد مستضد – ضد antigen–antibody complex.

يفيد تفاعل تثبيت المتممة (الشكل 98) في الكشف عن المستضد المجهول باستعمال ضد نوعي معلوم له القدرة على تثبيت المتممة.



الشكل 98: يُبيّن مختلف مراحل تفاعل تثبيت المتممة

ويجري هذا التفاعل على مرحلتين: في المرحلة الأولى (مرحلة تثبيت المتممة) يُمزج المستضد والضد لتشكيل معقد (في حال التوافق) قادر على تثبيت المتممة، وفي المرحلة الثانية (مرحلة الكشف عن التفاعل) يُضاف كاشف من كريات دم حمراء للخروف معلمة بأضداد موجهة ضد كريات الدم الحمر (5%).

ففي الاختبارات السالبة تبقى المتممة حرة بسبب عدم تشكل المعقد مستضد – ضد (العينة المفحوصة خالية من المستضدات)، وبالتالي قادرة على الارتباط مع كريات الدم الحمر المعلمة مؤدية إلى انحلالها.

أما في الاختبارات الإيجابية يتشكل المعقد مستضد – ضد (بسبب وجود المستضد النوعي في العينة المفحوصة) الذي تتثبت عليه المتممة، وبالتالي لا يحدث انحلال لكريات الدم الحمر بسبب عدم وجود جزيئات حرة للمتممة.

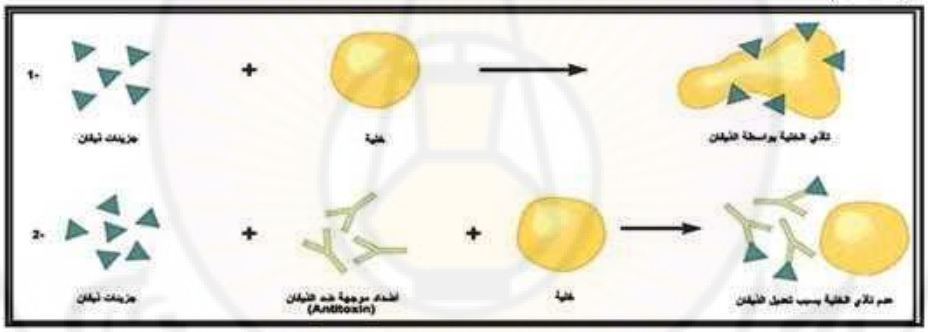
يُستعمل في هذا التفاعل عدد من الشواهد: أنبوب مصل شاهد (مصل + متممة + معلّق كريات دم حمراء معلمة في محلول ملحي)، أنبوب مستضد شاهد (مستضد + متممة + معلّق كريات الدم الحمر في محلول ملحي)، أنبوب يحوي المتممة و معلّق كريات الدم الحمر في محلول ملحي، وأنبوب يحوي فقط معلّق الكريات الحمراء في المحلول الملحي.

6- تفاعل التعديل Neutralization reaction

يُطلق على المستضد في هذا الاختبار (الشكل 99) اسم المستضد المعتدل (المتميز بفقدان قدرته على إحداث الخمج والإصابة نتيجة ارتباطه بالضد الذي يستطيع الحد من نشاطه).

يُطبق هذا الاختبار في الوسط الحي لتشخيص الإصابة بالدفتريا Diphteria (Schick test) والحمى القرمزية (Dick test, Schultz Charlton test).

كما يُطبق أيضاً في الوسط الصنعي من جهة لتشخيص الإصابات الفيروسية عن طريق إما إدخال فيروس معروف مع عينة مصلية مجهولة إلى مستنبت نسيجي لملاحظة الآثار الناتجة عن ذلك أو حقن الحيوانات والحصول على مصلها للفحص من أجل الكشف عن الأضداد (يشير وجود الأضداد إلى أن هذه الحيوانات محمية تجاه الخمج والإصابة).



الشكل 99: يُبيّن مبدأ تفاعل التعديل. (1) أثر الذيفان الجرثومي على الخلية، (2) تعديل الذيفان بالأضداد

كما يُستعمل لتشخيص العديد من الإصابات الجرثومية (كالإصابة بجراثيم العقديات الحالة β).

* معايرة الأضداد الموجهة ضد ذيفان العقديات "الستربتوليزين O"

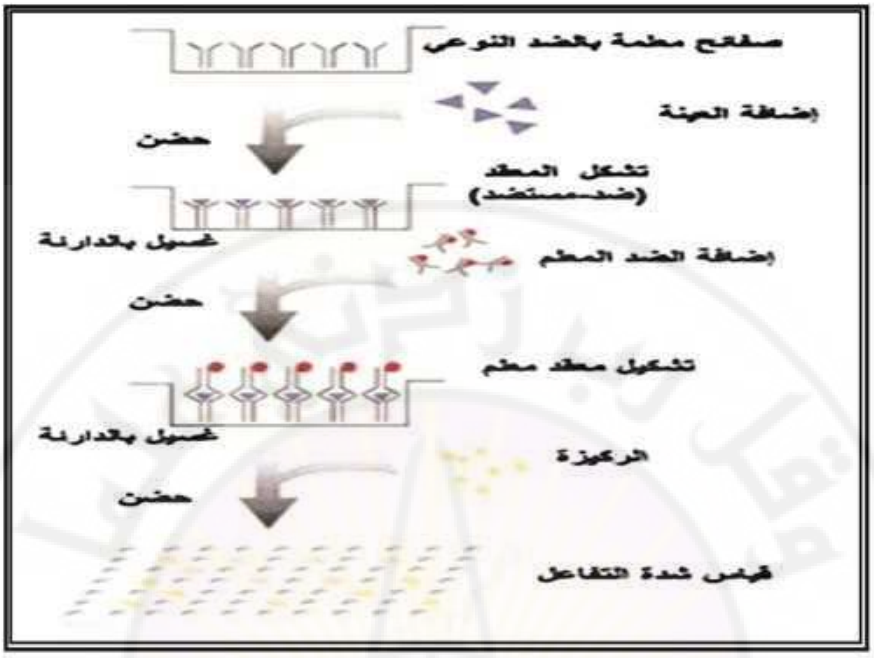
يُستعمل في هذا التفاعل ذيفان الستربتوليزين O "المادة الحالة السامة" كمستضد معلوم إلى جانب معلق كريات دم حمر للخروف (5%) في دارئة أو محلول ملحي. يجري في البداية تحضير تمديدات تسلسلية للعينة المصلية المجهولة في أنابيب اختبار

wasserman، ثم يضاف إلى كل الأنابيب كمية ثابتة من المستضد لتحضن بعدها بالدرجة 37 مئوية مدة 60 دقيقة. يضاف فيما بعد إلى كافة الأنابيب معلق كريات الدم الحمر (5%). يُستعمل في هذا التفاعل عدة أنابيب شاهدة: أنبوب يحوي المستضد فقط في محلول ملحي، أنبوب يحوي المستضد "الستربتوليزين O" ومعلق الكريات الحمر في المحلول الملحي (حدوث انحلال)، أنبوب يحوي معلق الكريات الحمر في المحلول الملحي (عدم حدوث انحلال).

تكون نتيجة التفاعل سلبية عند حدوث الانحلال في جميع الأنابيب باستثناء الشاهدين الأول فيه كريات الدم الحمر والثاني فيه المستضد فقط، في حين تكون النتيجة إيجابية عند عدم حدوث انحلال في الأنابيب الأولى الحاوية على الأضداد الموجهة ضد المستضد "الستربتوليزين O"، ويكون عيار هذه الأضداد هو العائد لآخر أنبوب لم يظهر فيه انحلال (أو التمديد الأعلى الذي لم يسبب أي انحلال).

7- اختبارات المقايسة المناعية الأنزيمية ELISA

يفيد اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية المباشر (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ، الذي يُستعمل فيه صفائح معلمة بجزيئات ضد نوعي معروف، في الكشف خاصة عن الإصابة بفيروس روتا Rotavirus عند الأطفال)، يُبيّن الشكل 100 المراحل المختلفة لاختبار المقايسة المناعية الأنزيمية، حيث يتم في نهاية الاختبار قياس الشدة اللونية للناتج باستعمال قارئ صفائح الإليزا ELISA reader (تتناسب الشدة اللونية مع كمية المستضد المرتبطة بالضد).

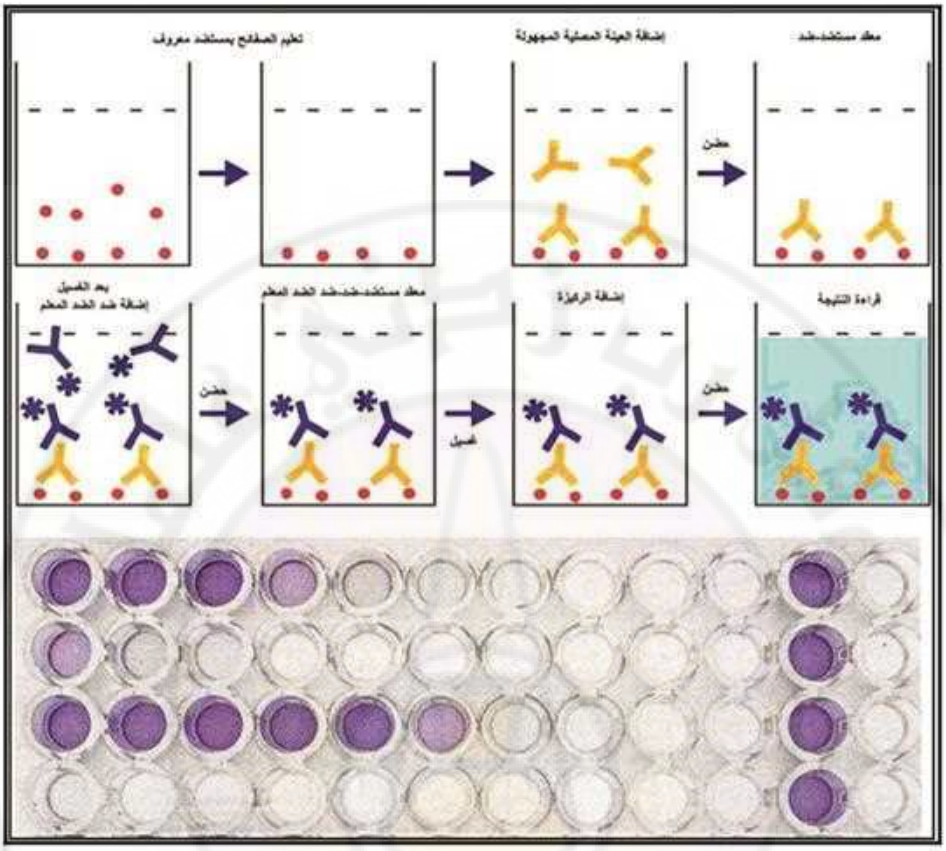


الشكل 100: يُبيّن مراحل اختبار المقايسة المناعية

في حين يُفيد اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية غير المباشر، في الكشف عن عدة أخماج طفيلية وفي تشخيص الإنتانات الجرثومية وفيروس الإيدز، من خلال تحري وجود الأضداد في العينة المصلية المفحوصة وتحديد تركيزها باستعمال مستضد معروف.

* تشخيص الإصابة بفيروس الإيدز

يبيّن الشكل 101 مراحل الكشف عن الأضداد النوعية الموجهة ضد فيروس الإيدز والمتشكلة في مصل المصاب بهذا الفيروس.



الشكل 101: مراحل تطبيق اختبار المقايسة المناعية غير المباشر للكشف عن فيروس نقص المناعة

يجري قياس كمية الأضداد المرتبطة بالمستضدات الفيروسية المعروفة بجهاز مقياس الطيف الضوئي spectrophotometer أو بقارئ الاليزا ELISA reader.

8- اختبار المقايسة المناعية الإشعاعية RIA

يُفيد اختبار المقايسة المناعية الإشعاعية Radioimmunoassay في قياس التراكيز المنخفضة للمستضد أو للضد وذلك باستعمال مستضدات معلمة بمادة مشعة (مثل: C^{14}; S^{35}; P^{30}; I^{125}) التي تلعب دور منافس. حيث يُستعمل هذا الاختبار الحساس في قياس التراكيز المنخفضة للهرمونات أو الأنزيمات أو المستضدات الجرثومية والفيروسية (كفيروس إنتان الكبد من النمط B).

تُتبع في هذا الاختبار نفس الخطوات المذكورة في المقايسة المناعية الأنزيمية، مع استخدام نظير مشع، حيث يتم في نهاية التفاعل قياس درجة الاشعاع الصادرة عن النظير المشع (باستعمال gamma counter)، التي تكون متناسبة مع كمية المعقد (مستضد موسوم – ضد) المتشكل.

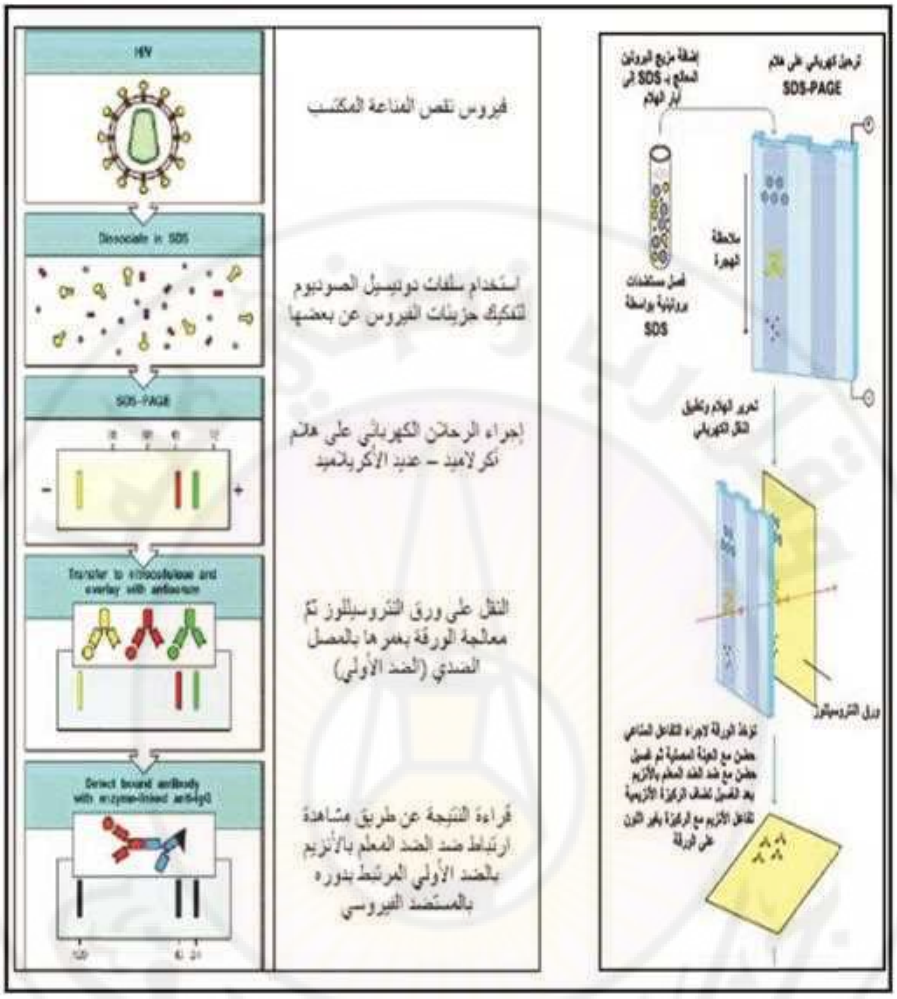
9- التبصيم المناعي Western blot

يفيد هذا الاختبار (المعقد نسبياً والذي يحتاج لوقت طويل والمكلف بالمقارنة مع اختبار المقايسة المناعية) في تأكيد نتيجة اختبار المقايسة المناعية المستعمل في تشخيص الإصابة بفيروس نقص المناعة وغيره من العوامل الممرضة.

لتشخيص الإصابة بالإيدز، يجري اختبار التبصيم على مرحلتين (الشكل 102):

– المرحلة الأولى: يتم فصل المستضدات البروتينية والبروتينية السكرية المختلفة من الفيروس بالرحلان الكهربائي (على هلام الأكريلاميد–عديد الأكريلاميد SDS–PAGE) تبعاً لأوزانها الجزيئية.

- المرحلة الثانية: يتم نقل هذه الجزيئات المفصولة كهربائياً على ورق النتروسيللوز التي تستعمل لاستكمال خطوات الاختبار المناعي. تُحضن شريحة النتروسيللوز الحاوية على المستضدات الفيروسية (بعد تقطيع الورقة إلى شرائح) بعد غمرها بالمصل البشري المراد فحصه، ثم تُغسل لتُحضن من جديد بعد غمرها بمحلول ضد الضد البشري المعلم بالأنزيم، أخيراً تُغسل وتُغمر بالركيزة الأنزيمية لمشاهدة نتيجة الاختبار المتمثلة بظهور تبدل لوني على الورقة ناتج تفاعل الأنزيم مع الركيزة (نتيجة حدوث ارتباط بين ضد الضد البشري المعلم بالأنزيم والأجسام الضدية الموجودة في المصل والتي بدورها ترتبط مع مستضدات الفيروس المتوافقة والمعروفة).



الشكل 102: مراحل تطبيق اختبار التبصيم المناعي

نظراً لقلة حساسية الطرق التشخيصية التقليدية (المجهرية، الاستنبات في الوسط الصنعي، المناعية) في تحري وجود بعض الكائنات الممرضة ولحاجتها إلى الوقت وإلى أخصائيين في دراسة العينات الطبية، كان لابد من اعتماد تقانات **البيولوجيا الجزيئية** التي تتصف بحساسيتها المرتفعة ودقتها العالية في تشخيص الأمراض المعدية عن طريق الكشف عن الـ DNA أو الـ RNA للعامل الممرض في العينة المفحوصة.

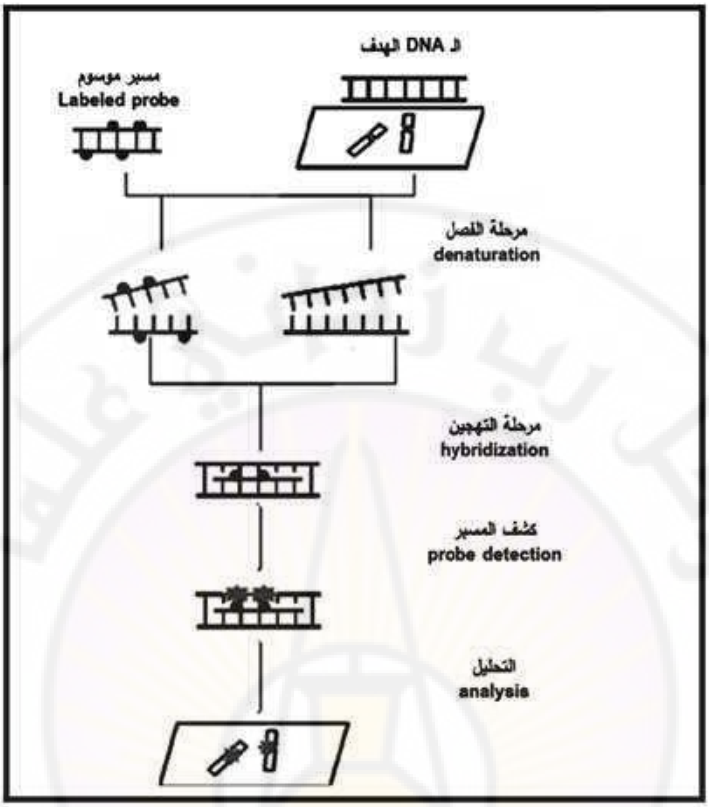
ثانياً: التشخيص الجزيئي Molecular diagnosis

يُكشف من خلال هذه التقانات عن الشدفة الهدف وهي تسلسل من النكليوتيدات المكونة للـ DNA أو الـ RNA وذلك باستعمال طرق تشخيص عديدة منها: التهجين الجزيئي molecular hybridization والتفاعل السلسلي للبوليميراز polymerase chain reaction (PCR).

1- طرق التهجين الجزيئي Molecular hybridization

تعتمد طرق التهجين على استعمال مسبر probe من الـ DNA أو الـ RNA المعلّم أو الموسوم labeled (من خلال وسم نيوكليوتيد واحد أو أكثر بإحدى طرق الوسم المعروفة سواء باستخدام عناصر مشعة أو ملونة، الخ..) تُصمم نيكليوتيدات المسبر لتكون متممة لنيكليوتيدات قطعة الـ DNA أو الـ RNA الهدف التي يتم الحصول عليها من العينة.

تبدأ العملية بالحصول على العينة من المصاب، لتتم معالجتها (إما مباشرة أو بعد استنباتها في الوسط الصنعي المناسب لزيادة عدد الكائنات الممرضة) من أجل تحرير جزيئات الـ DNA مضاعف السلسلة، يتم بعد ذلك فك السلسلتين عن بعضهما البعض عن طريق فصل الروابط الهيدروجينية (denaturation) نتيجة التعريض للحرارة والحصول على جزيئات DNA وحيدة السلسلة. يتم نقل الجزيئات وحيدة السلسلة إلى حامل صلب (مراشح أو ورق النتروسيللوز) لتصبح هذه الجزيئات الثابتة قابلة للتهجين مع المسبر الموسوم المتمم للكشف عن الشدفة الخاصة أو النوعية للكائن الحي الممرض. يجري التعرف على نتائج التهجين من خلال بقاء هذا المسبر الموسوم على المرشح أو ورق النتروسيللوز بعد إجراء عملية الغسل لإزالة الفائض من جزيئات المسبر غير المرتبطة، حيث يكشف عنه إما باستعمال أفلام حساسة للمواد المشعة، أو بإحدى طرق التلوين المناسبة لطريقة الوسم المستعملة (الشكل 103).



الشكل 103: يُبيّن مراحل تفاعل التهجين الجزيئي

2- التفاعل السلسلي للبوليميراز Polymerase Chain Reaction (PCR)

يسمح هذا التفاعل بمكاثرة أجزاء من الـ DNA (أو الـ RNA من نوع متخصص من الـ PCR) الهدف ملايين المرات (الشكل 104) دون الحاجة إلى استنبات الكائن الحي لإكثاره والحصول على كميات كبيرة منه.

الشكل 104: يُبيّن مراحل تفاعل السلسلي للبوليميراز (الـ PCR)

يُكشف عن القطع المضخمة إما بالرحلان الكهربائي باستعمال هلام الآغاروز والتلوين بملون بروم الايتيديوم ethidium bromide، أو عن طريق نقل نواتج الرحلان الكهربائي من الهلامة إلى ورق النتروسيللوز، تمهيداً لإجراء عملية التهجين المذكورة سابقاً باستعمال المسبر المعلّم أو الموسوم النوعي.

بشكل عام، تتميز طرق التضخيم بحساسيتها في الكشف عن الجزيئة الهدف، لأن تطبيقها سريع وسهل ودقيق من أجل الكشف عن العوامل الممرضة التي لا تنمو في الأوساط الصنعية، أو التي تحتاج إلى أوساط استنبات معقدة أو فترة حضانة طويلة، كما أنها تُعد مفيدة من أجل تطبيق المعالجة بالصادات الحيوية. ولكن على الرغم من ذلك فإن طرق التضخيم تتصف بأنها ذات محدودية في التطبيق، من جهة بسبب الحصول أحياناً على نتائج إيجابية خاطئة ناتجة عن حدوث تلوث مع حموض نووية لكائنات حية أخرى، ومن جهة أخرى بسبب كلفتها المرتفعة.

التطبيق العملي

تشخيص الخمج الطفيلي من خلال تطبيق بعض الاختبارات المصلية المذكورة أعلاه.
تدوين نتيجة التشخيص (إيجابية أو سلبية) مع تعليل النتيجة.

Damascus University

المصطلحات العلمية

باللغتين العربية والأجنبية

A

Acanthamoeba sp.	المتحولة الحرة
Acid fast	الحمض السريع
Adult	بالغ
Agglutination	تراص
Albumin	البومين
Amebiasis	داء الأميبات
Amniotic fluid	السائل الأمنيوسي
Amphitrichous	سوطين قطبيين
Amylase	الأميلاز
Amylopectin	الأميلوبكتين
Amylose	الأميلوز
Antibiotic	الصاد الحيوي
Antibody	الجسم الضدي
Ancylostoma duodenalis	الملقوات العفجية
Annealing	مرحلة الربط
Antigen	المستضد
Antigen–Antibody complex	معقد مستضد– ضد
Acquired immunity	مناعة مكتسبة
Arborescent	شجري
Ascaris lumbricoides	الصفَر الخراطيني
Aspirate	بزل / رشاحة

Atrichous	بدون سياط
Autoclave	الموصد
Auto-infestation	إصابة ذاتية

B

Babesiosis	داء البابيزيا
Bacillus anthracis	عصيات الأنتراكس
Barium salts	املاح الباريوم
Bacillus subtilis	عصيات الأنتراكس
Basophiles	أسسات
Beaded	حبيبي
Bent needle	إبرة معقوفة
Bilirubin	بيليروبين
Biopsy	خزعة
Bismuth salts	أملاح البزموث
Blood	دم
Bradizoites	أشكال ناشطة بطيئة
Bronchial fluid	السائل القصبي
Brucella	جراثيم البروسيلا
Brugia malayi	البروجية الملاوية

C

Calcium oxalate	أوكسالات الكالسيوم
Capsule	محفظة
Cardiolipin	الكارديوليبين
Carbol fuchin	الفوكسين الفحمي
Carmen dye	صباغ كارمن

catalase	الكتلاز
Cellophane tape	شريط لاصق
Cellulose	السيللوز
Cercariae	الذانبة / جنين مذنب
Cerebrospinal fluid	السائل الدماغي الشوكي
Cerebral biopsy	خزعة دماغية
Cestoda	الشريطيات
Charcot-leyden	شاركو لايدن
Chilomastix mesnili	شفوية السياط المينيلية
Chocolate blood	دم شوكولاتي
Circular	دائري
citrate	سيترات
Clonorchis sinensis	متفرعة الخصية
Clostridium	المطثيات
Clostridium botulinum	المطثيات البوتولينيوم
Clostridium perfringens	المطثيات الدخانية
Clostridium tetani	المطثيات الكزازية
Coagulase test	اختبار الكواغولاز
Color	لون
Colony	مستعمرات
Complement	متممة
Complex	معقد
Congo red	أحمر كونغو
Consistency	قوام
Convex	محدب

Corynebacterium diphtheriae	الوتديات الخناقية
Cryptococcus neoformans	المستخفية المحدثة
Cryptosporidium	البوغيات
Crystal	بلورة
Crystal violet	بنفسجي كريستhg
Curled	مجعد
Cyclospora	وحيد خلية بذيري
Cysticercus	كيسة حويصلي الذنب
Cysticercosis	داء الكيسات المذنبة

D

Denaturation	فصل
Detection	الكشف
Dientamoeba fragilis	المتحولة الثنائية الهشة
Digested	مهضومة
Dicrocoelium dendriticum	متفرعة المعي المغصنة
Differential	تفريقي
Dipylidium caninum	ثنائية الفوهات الكلبية
Diphyllobothrium latum	العوساء العريضة
Dry	جاف
Dark field	الحقل المظلم

E

Echinococcus granulosis	الشوكاء الحبيبية
Echinulate	شوكي
Effuse	متناثر
Egg	بيضة

Endolimax nana	الوئيدة القزمة
Enriched	غنية
Endothelial cell	خلية بطانية
Entamoeba coli	المتحولة القولونية
Entamoeba gingivalis	المتحولة اللثوية
Entamoeba hartmani	المتحولة الهارتمانية
Entamoeba histolityca	المتحولة الزحارية
Enteric fever	الحمى المعوية
Enterobacteriaceae	جراثيم معوية
Enterobius vermicularis	السرمية الدويدية / الحرقوص
Enterocytozoon	وحيد خلية بوغي
Entire	كامل
Eosine	إيوزين
Eosinophils	الحمضات
Epitope	المعينة المستضدية
Erythrocyte	كرية حمراء
Escherichia coli	الإيشريكية القولونية
Ethidium bromide	بروم الايتيديوم
Exoenzymes	الأنزيمات الخارجية
Extension	مرحلة الاستطالة

F

Fasciola hepatica	المتورقة الكبدية
Fastidious	صعبة النمو
Fat drop	قطرة دسم
Fatty acid crystals	بلورات الحموض الدسمة

Fermentation	تخمر
Fibers	ألياف
Filamentous	خيطي
Filariasis	داء الخيطيات
Filariform larva	يرقة خيطية
Filiform	نمو خيطي
Fixation	تثبيت
Flagellata	السوطيات
Flat	مسطح
Flotation	التعويم
Formaldehyde	فورم الدهيد
Formed	صلب

G

Gamete cell	خلية عرسية
Gelatinase	الجيلاتيناز
Gentian violet	بنفسجي جانسن
Giardiasis	داء الجيارديا
Giardia intestinalis	الجيارديا المعوية
Giemsa stain	ملون غيمزا
Glycerin	غليسرين
Gram stain	ملون غرام
Gravid	كهلة

H

Haematoxylin	هيماتوكسيلين
Helminthes	الديدان

Histological biopsy	خزعة نسيجية
Humoral response	استجابة خلطية
Hybridization	التهجين
Hydatid cyst	كيسة عدارية / مائية
Hymenolepis nana	محرشفة قزمة
Hymenolepis diminuta	محرشفة صغيرة

I

Immature	فتية
Immunoglobulins	الغلوبلينات المناعية
Immunofluorescence	التألق المناعي
Indole	الأندول
In Vitro	في الزجاج
In Vivo	وسط حي
Iodamoeba butschlii	المتحولة اليودية البوتشيلية
Iodine	الإيودين
Irregular	غير منتظم
Isospora	متماثلة الأبواغ

K

Klebsiella pneumonia	جراثيم الكلبسيلا الرئوية

L

Larva	اليرقة
Lecithin	الليسيتين
Leishmania braziliensis complex	معقد الليشمانية البرازيلية
Leishmania donovani complex	معقد الليشمانية الدونوفانية
Leishmania tropica complex	معقد الليشمانية المدارية

Leukocytes	كريات بيض
Lipopolysaccharid	عديد السكاكر الشحمي
Loa loa	اللوا اللوية
Lobate	مفصص
Labeled antigen	مستضد موسوم
Labeled probe	مسبر موسوم
Lophotrichous	حزمة سياط في أحد القطبين
Lugol's stain	ملون لوغول
Lumbar puncture	بزل قطني
Lymphocytes	اللمفاويات

M

Macro gamete	خلية عرسية كبرية
Macrophage	خلية بلعمية
Malachite green	أخضر مالاشيت
Malaria	البرداء
Malta fever / Melitensis	الحمى المالطية
Mast cell	خلية بدينة
Mature	ناضج
Maurer's dots	حبيبات مورر
Measles virus	فيروس الحصبة
Media	أوساط
Meningitis	التهاب السحايا
Meracidiae	جنين مهدب
Methanol	ميتانول
Methylene bleu	أزرق الميتيلين

Microsporidia	وحيدات خلية متبوغة
Mild	لين
Millipore filter	مرشح دقيق
Molecular diagnosis	تشخيص جزيئي
Molecular hybridization	التهجين الجزيئي
Monocytes	وحيدات
Monotrichous	سوط وحيد قطبي
Motility	الحركية
Mycolic acid	حمض الميكوليك
Mycobacterium leprae	المتفطرات الجذامية
Mycobacterium tuberculosis	المتفطرات السلية

N

Naegleria fowleri	نيجلاريا
Nasopharyngeal	أنفي بلعومي
Needle loop	إبرة ذات عقدة
Nemathelminthes	الممسودات / الخيطيات
Neutralization	تعديل
Neutrophiles	عدلات
Nocardia	فطر النوكارديا
Nonspecific urethritis	التهابات مهبلية غير نوعية
Nystatin	نستاتين

O

Obstructive Jaudice	يرقان انسدادي
Oocysts	بيضة كيسية
Ookinete	بيضة متحركة

Operculated	غطائية
Oxidase	الاكسيداز

P

Paragonimus westermani	جانبية المناسل الويسترمانية
Pasty	عجيني
Peptidoglycan	ببتيدوغليكان
Peritrichous	سياط على كامل الجسم
Phosphotungstic acid	حمض الفسفوتنغستيك
Picric acid	حمض البيكريك
Plant cell	خلية نباتية
Plasmodium falciparum	المتصورات المنجلية
Plasmodium malariae	المتصورات الوبالية
Plasmodium ovale	المتصورات البيضاوية
Plasmodium vivax	المتصورات النشيطة
Platelets	صفيحات دموية
Pneumocystis carinii	المتكيسة الرئوية
Polymerase Chain Reaction	التفاعل السلسلي للبوليميراز
Pour plate	طبق مصبوب
Pollens	غبار الطلع
Primers	بوادىء
Proglottid	حلقة
Protease	بروتياز
Protoscolex	رؤوس أولية
Protozoa	وحيدات خلية
Pseudocysts	أكياس كاذبة

Pseudopodes	أرجل كاذبة
Pulmonary biopsy	خزعة رئوية
Pulmonary fluid	سائل رئوي
Pulvinate	كثير التحدب
Punctiform	نقطي
Pus	قيح

R

Raised	مرتفع
Radioimmunoassay	المقايسة المناعية الاشعاعية
Reaction	تفاعل
Rediae	الريدية
Renal tuberculosis	السل الكلوي
Reticuloendothelial system	الجملة الشبكية البطانية
Rhabditiform larva	اليرقة الريدية
Rhizoid	جذري
Ring form	الشكل الخاتمي
Rizopoda	جذريات الأرجل
Rostellum	حيزوم
Rotavirus	روتا فيروس
Rough	خشن

S

Safranin	سفرانين
Salmonella	السالمونيلا
Schaudinn solution	محلول شودين
Schistosama haematobium	منشقة دموية

Schistosama mansoni	منشقة معوية
Schizonte	شكل شطائري
Schuffner's dots	حبيبات شوفنر
Scolex	رأس
Sedimentation	ترسيب
Selective	انتقائية
Semi-formed	نصف صلب
Shigella	الشغيلا
Simple	بسيط
Smooth	أملس
Sodium citrate	سيترات الصوديوم
Soft	طري
Spectrophotometer	مقياس الطيف الضوئي
Spirillum	لولبيات
Sporocyst	كيس أبواغ
Spores	أبواغ
Sporozoa	بذيريات
Sporozoite	عنصر بذيري
Spread plate	طبق منتشر
Sputum	قشع
Staphylococcus aureus	العنقوديات الذهبية
Staphylococcus epidermidis	العنقوديات الجلدية
Starch	نشاء
Stercobilin	ستيركوبيلين
Stool	براز

Streaking	تخطيط
Streptococcus mutans	العقديات المشوهة
Streptococcus pneumoniae	العقديات الرئوية
Streptococcus pyogenes	العقديات المقيحة
Strongyloides stercoralis	الإسطوانية البرازية
Sucker	محجم
Suction discs	أقراص تثبت
Syphilis	الداء الإفرنجي

T

Tachyzoites	أشكال ناشطة سريعة
Taenia saginata	الشريطية العزلاء
Taenia solium	الشريطية المسلحة
Tannic acid	حمض التانيك
Teichoic acid	حمض التايكوييك
Thermocycler	
Thick smear	لطاخة ثخينة
Thin smear	لطاخة رقيقة
Throat specimens	عينات الحلق
Toluidine bleu	أزرق التولويدين
Tourniquet	رباط مطاطي
Toxoplasma gondii	المقوسة القندية
Trematoda	المثقوبات
Treponema pallidum	اللولبيات الشاحبة
Trichinella spiralis	الشعرينة الحلزونية
Trichomonas hominis	المشعرة البشرية

Trichomonas vaginalis	المشعرة المهبلية
Trichrom	ثلاثي كروم
Trichuris trichura	شعرية الرأس
Trophozoite	أتروفة / الشكل الناشط
Trypanosomiasis	داء المثقبيات
Trypanosoma brucei	المثقبي البروسي
Trypanosoma cruzi	المثقبي الكروزي
Trypanosoma gambiens	المثقبي الغامبي

U

unbonate	بروز / نتوء مركزي
Undegisted	غير مهضوم
Undulate	متموج
Urease	يورياز
Urine	بول

V

Vibrio cholera	ضمات الكوليرا

W

Watery	مائي
Western blot	التبصيم المناعي
Wrinkled	مجعد
Write stain	ملون رايت
Wuchereria bancrofti	الفخرية البنكروفتية

Y

Yeast	خميرة
Yersinia pestis	جراثيم اليرسينيا

Z

Zeil–Neelson stain	ملون زايل نلسون

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

المراجع الأجنبية

- **Baron S, (2005).** Medical Microbiology. 5th Edition.
- **Blagburn B, & Dryden MW, (2000).** Pfizer atlas of veterinary clinical parasitology. Pfizer Inc.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2010).** Parasites.
- **Garcia LS, (2007).** Diagnostic medical parasitology, 5th Edition, Washington, DC, ASM Press
- **Garcia LS, (2009).** Practical guide to diagnostic parasitology, Washington, DC, ASM Press.
- **Gladwin M, & Trattler B, (2000).** Clinical microbiology. 2d Edition, MedMaster, Inc. Miami.
- **Gillespie SH, & Pearson R, (2001).** Principles and practice of clinical parasitology. John Wiley & Sons, LTD
- **Gupte S, (2010).**The Short Textbook of Medical Microbiology (Including Parasitology). 10th Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers, LTD
- **Harley JP, (2005).** Laboratory exercises in microbiology. 6th Edition, Kentucky University, the McGraw-Hill, Higher Education Publisher.
- **Harvey RA, Champe PC & Fisher BD, (2007).** Lippincott's illustrated reviews: microbiology. 2d Edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business.
- **John DT, & Petri WA, (1999).** Medical parasitology. 9th Edition. Elsevier Saunders.

- **Leboffe MJ, & Pierce BE, (2016).** Microbiology : Laboratory Theory and Application, Brief, 3e Lab. 3d Edition. Morton Publishing Company.
- **Levinson W**, & **Jawetz E, (2005).** Medical Microbiology & Immunology.
- **Levinson W, (2010).** Review of medical microbiology and immunology. 11th Edition. McGraw Hill Medical.
- **Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakeline D, & Zuckerman M, (2004).** Medical microbiology. Updated 3d Edition, Elsevier, Mosby.
- **Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (2009).** Medical microbiology, 6th Edition, Philadelphia, Mosby.
- **Pierce BE, (2010).** Microbiology Laboratory Theory and Application Morton Publishing Company..
- **Revillard JP, & Fridman WH, (1997).** Immunology. 4th Edition. DeBoeck Université.
- **Stepp CA, & Woods M, (1998).** Laboratory procedures for medical office personnel. WB Saunders company.
- **Talaro KP, (2005).** Foundation in Microbiology. 5th Edition.
- **Zeibig EA, (2013).** Clinical Parasitology. A practical approach. 2d Edition. Elsevier, Saunders.

اللجنة العلمية

- الأستاذ الدكتور محمد موسى النعمة
- الأستاذ الدكتور حسن ناصر الدين
- الأستاذ المساعد الدكتورة سحر الخطيب

المدقق اللغوي

الدكتور بسام البردان

حقوق الطبع والترجمة والنشر محفوظة لمديرية الكتب والمطبوعات الجامعية