عائلة الأمعائيات
Enterobacteriaceae

تعيش أنواع كثيرة من الأمعائيات في أمعاء الحيوانات والإنسان وينتشر الكثير من هذه الجراثيم في الطبيعة (في التربة والمياه وعلى النباتات) .

تتشابه معظم أنواع الأمعائيات في العديد من الخواص حيث أنها : عصيات مستقيمة متوسطة الحجم ، سلبية الغرام متحركة بواسطة سياط محيطية ما عدا بعض الأنواع لا تشكل أبواغاً ، هوائية ولا هوائية مخيرة ' تستطيع النمو في المنابت العادية غير الغنية مثل الآجار المغذي تضم عائلة الأمعائيات ٢٨ جنساً و أهم هذه الأجناس هي :

جنس السالمونيلا salmonella جنس الإشريكية Escherichia ، جنس اليرسينية Yersyinia ،جنس الشيغيلة Shigella ، جنس المتقلبة Proteus .

جنس السالمونيلا
Salmonella

تعتبر السالمونيلات من الجراثيم الممرضة المنتشرة بكثرة في الطبيعة ، وينتمي جنس السالمونيلا إلى عائلة الأمعائيات تسبب جراثيم السالمونيلا عند الإنسان الحمى التيفية الخطرة

وهذه الجراثيم إما أن تكون متحركة أو غير متحركة .

وتصنف جراثيم السالمونيلا التي تصيب الدواجن بحسب نوعيتها للعائل (للطيور) إلى :

١. **جراثيم السالمونيلا التي تحدث إصابات شديدة في الطيور (تكون نوعية للطيور فقط)**

السالمونيلا يللورم S.pullorm تسبب مرض (الإسهال الأبيض) أكثر إصابة للأعمار الصغيرة من الطيور

السالمونيلا غالياروم S.gallinarum تسبب مرض (الحمى التيفية) تصيب الأعمار الكبيرة من الطيور

وحاليا لايفرق بين السالمونيلا بللورم وغالياروم ويتم اعتبار أنهما يسببان مرض واحد للطيور يسمى الحمى التيفية sallmonilosis

٢. **جراثيم السالمونيلا التي تصيب والإنسان والحيوانات الأخرى (غير نوعية للطيور)**

مثل جراثيم السالمونيلا تيفيموريم S.typhimurium التي تتواجد عند الفئران ولكن هذه الجراثيم اذا أصابت الدواجن فإنها تسبب ما يسمى(نظير التيفوئيد عند الطيور) .

ويوجد العديد من الجراثيم الممرضة للإنسان مثل السالمونيلا التيفية S.typhi ،والسالمونيلا نظيرة التيفية أ ،والسالمونيلا نظيرة التيفية س وهي نوعية للإنسان ونادرا ما تعزل من حيوانات أخرى

أولاً- الخواص الشكلية والتلوينية

السالمونيلات عصيات سلبية العزام مستقيمة غالبا طولها (٢-٥)ميكرون عرضها(٠,٧-١,٠)ميكرون متحركة بواسطة سياط محيطية **باستثناء** السالمونيلا بللورم والسالمونيلا غالينابروم فهي غير متحركة، تحاط جراثيم السالمونيلا بخمل وليس لها محفظة وغير متبوغة .

ثانياً- الخواص البيو كيميائية لجراثيم السالمونيلا:

تخمر جراثيم السالمونيلا سكر الجلوكوز ولا تخمر سكاكر اللاكتوز والسكروز هذا أهم ما يميزها عن جراثيم الاشريكية القولونية.

ثالثاً- الخواص المزرعية :

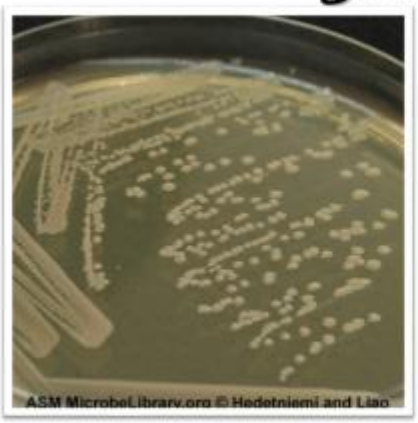
جراثيم هوائية لاهوائية مخيرة تنمو على المنابت العادية بدرجة حرارة ٣٧ م مدة ١٨-٢٤ ساعة

A-منبت الآغار المغذي:

تشكل مستعرات صغيرة ملساء محدبة قطرها ٢-٤ ملم أصغر حجما من مستعمراتE.coli وتكون المستعمرات دقيقة جدا تشبه قطرات الندى مثل السالمونيلا بللورم .

وتشكل ذراري السالمونيلا المعزولة حديثا مستعمرات ملساء (S) ويمكن أن تتحول إلى مستعمرات خشنة (R) مجعدة مسننة الحواف بعد الزرع المتكرر.

الآجار المغذي مستعمرات صغيرة تشبه *قطرات الندى*



B-منابت الإكثار :

تعيش عصيات السالمونيلا في القناة الهضمية بشكل متعايش مع العديد من الجراثيم الأخرى لذلك من الضروري زيادة عددها في مرق الإكثار الذي يثبط نمو الأنواع الجرثومية المعوية الأخرى (فلا يسمح بنمو المكورات المعوية والمكورات العنقودية مثلا) وينشط نمو عصيات السالمونيلا فقط .

ومن هذه المنابت مرق السيلينات Selenite broth ومرق التتراثيونات Tetrathionate broth ومنبت رابابورت

C-**المنابت الانتقائية والتميزية :**

١-منبت ما كونكي ، و **منيت آجار أيوزين أزرق المثيلين(EMB)** ، و**منبت آجار السالمونيلا والشيجلا (S.S Agar)**

تشكل السالمونيلا على هذه المنابت مستعمرات متشابهة حيث تكون المستمرات شاحبة لأن هذه الجراثيم لا تخمر اللاكتوز الموجود في المنبت .

بالإضافة لذلك تكون المستعمرات في منبتS.SAgar ذات مركز أسود لأنها تشكل غاز H2S كبريت الهيدروجين.

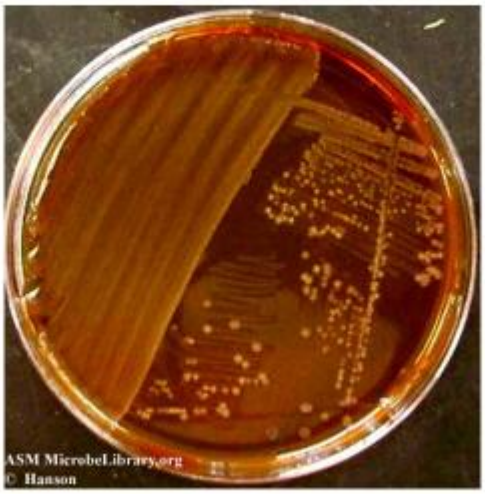
آجار السالمونيلا والشيجلا S.S Agar

ينمو عليه جراثيم الشيجلا – والسالمونيلا (ذات المركز أسود)

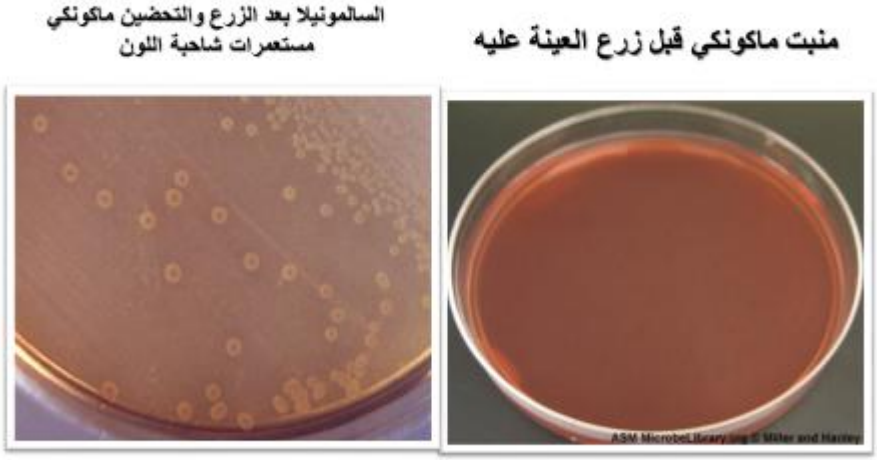
منبت EMB

آجار أيوزين أزرق المثيلين

مستعمرات شاحبة اللون



منبت آجار ماكونكي
Macconky agar



٢- منبت دي أوكسي كولات بالكسيلوز و اللابزين (XLD)

هو منبت تمييزي يحتوي المنبت على سكاكر اللاكتوز و كسيلوز و سكروز و حمض أميني اللايسين ومواد لكشف انطلاق H2S وكاشف أحمر الفينول

تخمر الجراثيم هذه السكاكر (تخمر جراثيم السالمونيلا فقط سكر الجلوكوز) ولكنها تنتزع مجموعة الكاريوكسيل (COOH) من اللايسين وبالتالي يصبح الوسط قلويا فتشكل مستعمرات حمراء ذات مركز أسود بينما جراثيم الاشريكية تشكل على هذا المنيت مستعمرات صفراء(لأن الإشريكية القولونية تخمر هذه السكاكر فيصبح الوسط حمضي يظهر لون أصفر)

٣- منبت آجار الخضرة اللامعة (B.G Agar) Brilliant Green Agar

يحتوي على سكاكر لاكتوز سكروز وعلى صبغة الخضرة اللامعة هو منبت انتقائي لاتنمو عليه الجراثيم المعوية الاخرى لأنه يحتوي على صبغة خضرة اللامعة التي تمنع نمو الأمعائيات الأخرى فتنمو فقط جراثيم السالمونيلا التي لا تخمر هذه السكاكر لكنها تفكك الببتون ⟸ وسط قلوي وتتشكل مستعمرات حمراء اللون

٤- منبت آجار الحديد والسكاكر الثلاثة (T.S.I) Triple Sugar Iron

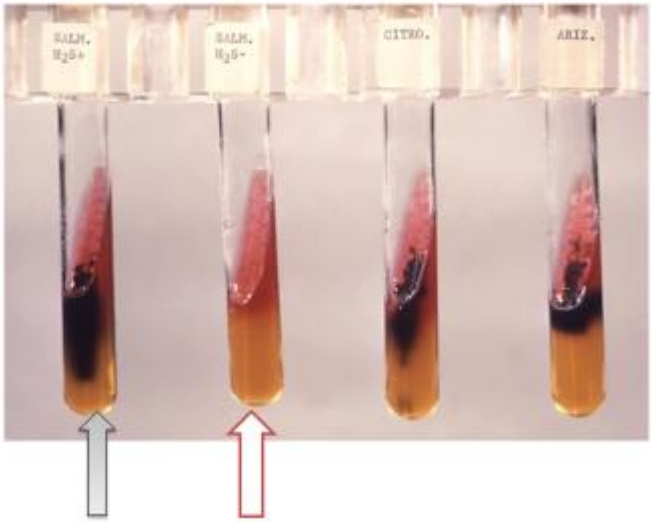
وهو منبت صلب مائل يحتوي على سكاكر الجلوكوز واللاكتوز والسكروز وكاشف احمر الفينول ومواد لكشف انطلاق غاز كبريت الهيدروجين H2S

بعد زرع السالمونيلا يصبح لون عمود المنبت أصفر نتيجة تخمر الجلوكوز والجزء المائل للمنبت أحمر وبتلون وسط الأنبوب بلون اسود نتيجة لتشكل H2S

ملاحظة : عند صب المنبت ونتيجة كثافة سكر الجلوكوز ينخفض لأسفل الأنبوب أما اللاكتوز يبقى منتشر في كامل المنبت ولذلك يتخمر الجلوكوز المتوضع في الجزء السفلي (عمود المنبت) ويعطي اللون الأصفر .

منبت TSI agar

المنبتين ١و٢ من اليسار هما سالمونيلا مع وبدون h2s



٥- **منبت آجار الحديد لكليجر** kliglar Iron Agar

تكون نتائج النمو مشابهة للمنبت السابق (آجار الـ TSI)

منبت كليجر

يلاحظ نتائج مشابهة لمنبت آجار الحديد والسكاكر الثلاثة TSI :

الجزء المائل أحمر

عمود المنبت أصفر

ولون أسود في وسط العمود

منبت يسار قبل التحضين

منبت يمين بعد التحضين

ملاحظة ليس كل أنواع السالمونيلا تطلق h2s

٦- **منبت آجار اللايسين والحديد (L.I Agar)** lysine Iron agar

وهو منبت صلب مائل يحتوي هذا المنبت على جلوكوز ولابزين وكاشف بروم كريزول القرمزي ومواد لكشف انطلاق H2S

بعد زرع عصيات السالمونيلا نلاحظ في البداية تشكل حمض نتيجة تخمر الجلوكوز فيتلون المنبت باللون الأصفر ثم نتيجة تفكك اللابزين يتشكل وسط قلوي يصبح عمود المنبت والجزء المائل قرمزي ثم ينتشر اللون الأسود في المنبت نتيجة انطلاق غاز كبريت الهيدروجين.

رابعاً- تشخيص داء السالمونيلات

أولا – أخذ العينات :

تؤخذ عينات من الكبد ،المرارة، الطحال، القلب، دم القلب ومن الأمعاء والأعورين ومسحات مذرقية الطيور الحية مع الانتباه إلى أن الطيور المصابة بالحمى نظيرة التيفية تطرح جراثيم السالمونيلا مع البراز في فترات متقطعة لذلك يجب أخذ مسحات مذرقية من عدد كبير من الطيور ويمكن غمس عدة مسحات معا في منبت إكثار واحد ويجب ترك الطيور الحية المعالجة بالمضادات الحيوية عدة أيام بعدها يمكن أخذ عينات من هذه الطيور لإجراء الزرع الجرثومي .

ثانيا – إكثار جراثيم السالمونيلا على المنابت :

A-إن السالمونيلا بللورم والسالمونيلا غالياروم لاتنمو جيدا في مرق السيلينات ومرق التترايثونات وفي آجار الخضرة اللامعة لذلك يفضل زرع العينات المأخوذة من الطيور في منبت إكثار خاص بها هو منبت رابابورت وتؤخذ منه العينات بعد تحضينه مدة ٢٤ساعة لتزرع على المنابت الانتقائية للسالمونيلا

B- وفي نفس الوقت الذي تزرع به العينات على منبت الإكثار يمكن زرع عينات مباشرة على منبت انتقائي مباشرة مثل ماكونكي (ويلاحظ تشكل مستعمرات حمراء اللون الدالة على جراثيم السالمونيلا)

وكذلك تزرع أيضا على منبت XLD (ويلاحظ تشكل مستعمرات حمراء ذات مركز أسود)

C- ثم تؤخذ عينات من من منابت الإكثارو تزرع بدرجة ٣٧ درجة مدة ٢٤سا على منبت أجار الحديد بالسكاكر الثلاثة TSI (ويلاحظ قعر أحمر ولون الجزء المائل أصفر وانتشار لون أسود..)

أو على منبت آجار الحديد واللايزين (LI)(فيصبح لون الجزء المائل عمود المنبت قرمزي وانتشار اللون الأسود)

ثالثا-إجراء اختبار التراص على الشريحة :

بعد الزرع على المنابت نجري اختبار التراص السريع على الشريحة التمهيدي للتنميط بأخذ مسحة من المستعمرة الجرثومية التي قمنا بزرعها وأعطت نتائج مماثلة لمستعمرات السالمونيلا فيضاف لها قطرة من من المصل الحاوي على أضداد السالمونيلا فعند ظهور التراص على الشريحة تعتبر النتيجة ايجابية وفي حال عدم حدوث التراص تعتبر النتيجة سلبية .

رابعاً- الاختبارات المصلية في الطيور (للكشف عن الأضداد (الأجسام المضادة) في الطيور المصابة)

١- اختيار تراص الدم الكامل السريع

يستخدم للكشف عن الطيور الحاملة للسالمونيلا بللورم أو غالياروم أو التيفيموريوم

يوضع على شريحة(قطرة دم كامل تأخذ من الطيور + قطرة من مستضد السالمونيلا بللورم الملون ببنسفجية الكريستال) تمزج وتقرأ النتيجة خلال ١-٢ دقيقة

فعند وجود كتل دقيقة من المستضد تعتبر نتيجة ايجابية

أما في حال عدم وجود تكتلات تعتبر النتيجة سلبية

٢- اختبار التراص المصلي السريع

لكشف الطيور الحاملة للسالمونيلا التيفية الفأرية

يوضع على شريحة(قطرة من مصل دم الطيور المشتبه بإصابتها + قطرة من مستضد السالمونيلا الملون) تمزج وتقرأ النتيجة خلال ١-٢ دقيقة

وجود تكتلات ⟸ نتيجة ايجابية

عدم وجود تكتلات ⟸ نتيجة سلبية

٣- اختبار الإليز Elisa

لكشف أضداد السالمونيلا الملهبة للأمعاء في مصل دم الدجاج .

تذكرة : أنواع الجراثيم حسب حاجتها للهواء

١- هوائية مجبرة : تحتاج O2 الحر الموجود في الهواء تنمو على سطح المنبت

٢-لا هوائية مخيرة: تحتاج O2 المركب تنمو في القسم السفلي للمنبت

٣-لا هوائية هوائية مخيرة : تعيش بوجود O2 الحر أو O2 المركب

٤- أليفة الهواء القليل : تحتاج القليل من O2 والكثير من CO2 .

نهاية البحث الأول

عائلة الأمعائيات
٢ - جنس الإشريكية
Escherichia

ينتمي جنس الإشريكية لعائلة الأمعائيات ،و يضم هذا الجنس عدة أنواع أهمها الإشريكية القولونية E.coli و أنواعاً أخرى مثل الإشريكية البلاتية E.blattae والإشريكية بيرماني E.bermanni وغيرها .

الإشريكية القولونية Eschrichia coli

لقد عزلها لأول مرة العالم إشريش (Esherich) عام ١٨٨٥ في براز الأطفال الرضع حيث تدخل الإشريكية القولونية إلى الأمعاء الغليظة والقسم السفلي للأمعاء من الأمعاء الدقيقة للثدييات بعد عدة ساعات من الولادة وتعيش كأحد أفراد النبيت الجرثومي الطبيعي في الأمعاء والذي يدعى (FLORA) .

وللإشريكية القولونية عدة أنماط مصلية وتتميز بعض ذراريها بالقدرة على الالتصاق على مخاطية الأمعاء الدقيقة والقدرة على تشكيل مستعمرات عليها وإنتاج الذيفانات وتسبب أمراض مختلفة في الإنسان والحيوان فتسبب عند الدواجن داء القولونيات (التهاب السرة – التهاب العين – التهاب الأكياس الهوائية – والتهاب المفاصل ....).

تسبب e.coli أمراض مختلفة عند الدواجن نذكر منها

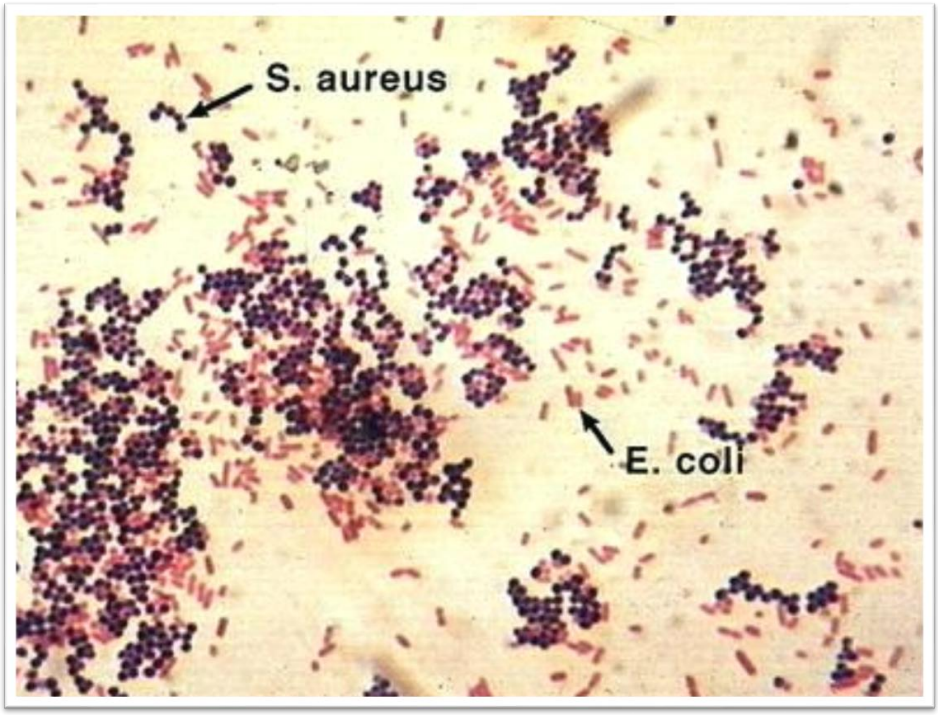
- ✓ التهاب الأكياس الهوائية
- ✓ التهاب العين
- ✓ التهاب السرة
- ✓ التهاب كيس المح
- ✓ التهاب الغشاء الزليلي
- ✓ التهاب الأنسجة تحت الجلد
- ✓ التهاب العظام

بالإضافة إلى العديد من الأمراض الأخرى

ملاحظة : بعض الأنماط المصلية قد تكون ممرضة للدواجن وغير ممرضة للحيوانات الأخرى.

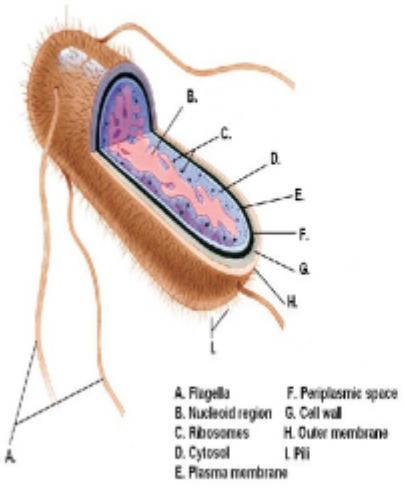
الخواص الشكلية والتلوينية :

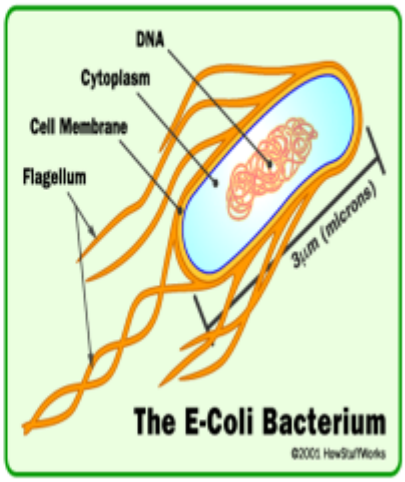
عصيات مستقيمة أطرافها مدورة سلبية الغرام تتصبغ بسهولة بالملونات العادية يتراوح طولها ٢-٣ ميكرون العرض ٠,٩ ميكرون معظم ذراريها متحركة بواسطة سياط محيطية غير قادرة على التبوغ ونلاحظ وجود محفظة دقيقة عند بعض أنماطها المصلية.



صورة توضح شكل جراثيم الاشركية القولونية والمكورات العنقودية مجهرياً

الخواص الشكلية والتلوينية





الخواص البيوكيميائية :

تخمر جراثيم E.Coli سكاكر الغلوكوز والسكروز واللاكتوز وتنتج غاز بينما جراثيم السامونيلا تخمر سكر الغلوكوز

الخواص المزرعية :

جراثيم هوائية اولا هوائية مخيرة ، تنمو بسهولة على المنابت العادية بدرجة م٣٧ دون إضافة دم أو مصل ، تفوح من مزارعها رائحة البراز ،تحلل بعض الأنماط المصلية كريات الدم الحمراء في الآجار الدموي .

١. المرق المغذي : تعكر المرق المغذي نتيجة النمو وقد تشكل راسب قليل يتفتت بسهولة وينتشر في السائل عند الرج .

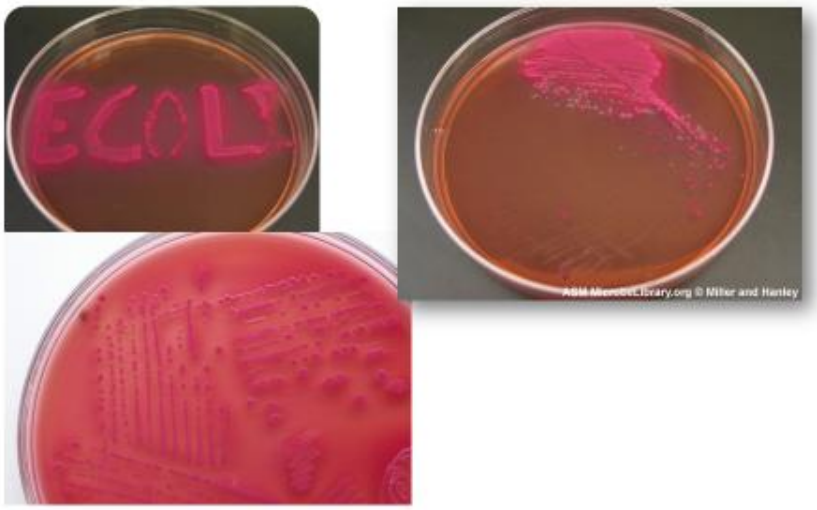
٢. الآجار المغذي : تتشكل مستعمرات رمادية ملساء .

المنابت التميزية للإشريكية القولونية

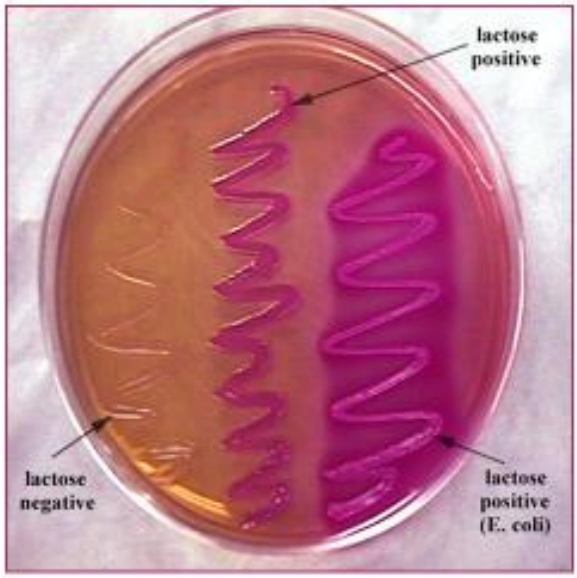
١- **منبت ماكونكي:** تنمو عليه الإشريكية القولونية و تشكل مستعمرات زهرية اللون لأنها تخمر اللاكتوز الموجود في المنبت فيتشكل حمض يغير لون الكاشف الأحمر

إلى لون زهري (أما جراثيم السامونيلا التي لا تخمر اللاكتوز ←مستعمرات شاحبة)

منبت ماكونكي e.coli

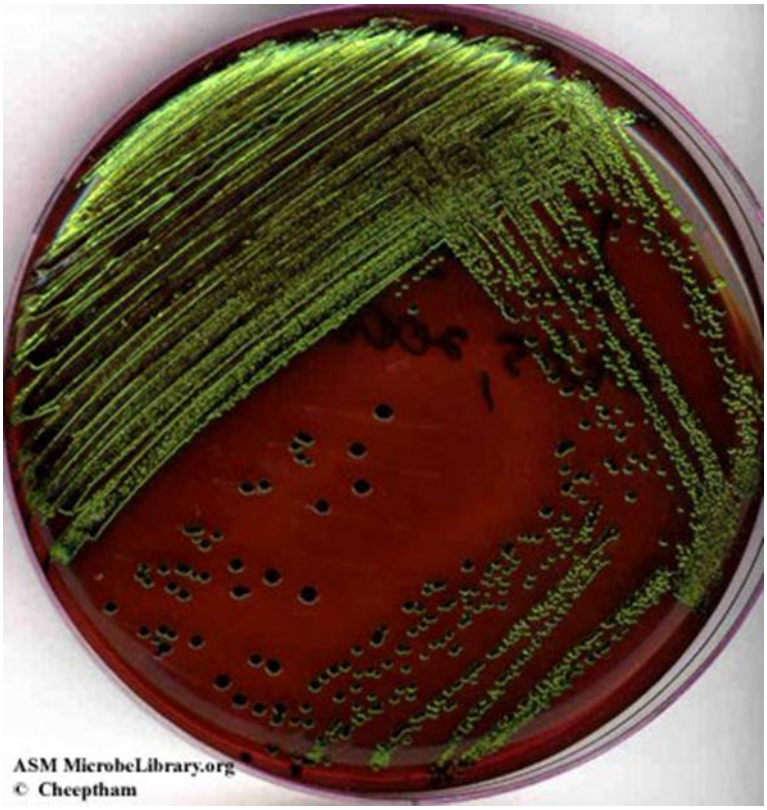


منبت ماكونكي Maconky Agar



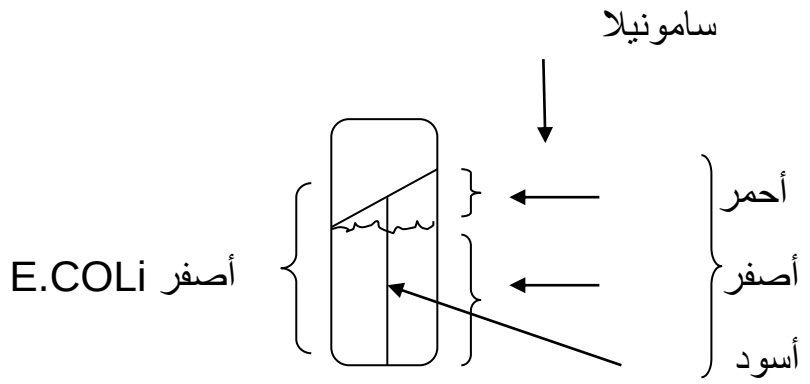
٢- منبت آجار الأيوزين وأزرق الميتيلين EMB

تخمر الإشريكية سكري اللاكتوز والسكروز الموجودين في المنبت وتشكل مستعمرات زرقاء ذات لمعة معدنية .

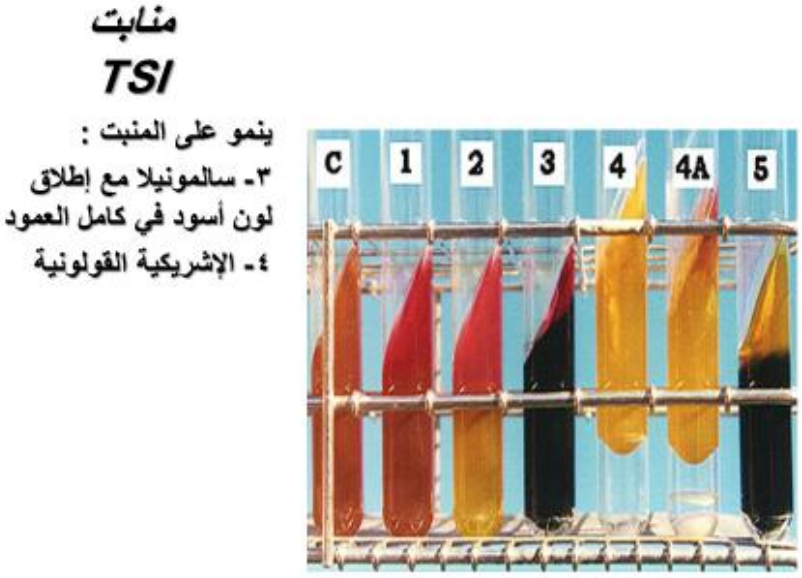


EMB زرعت عليه جراثيم E.coli

٣- منبت آجار الحديد ثلاثي السكر T. S.L تخمر الإشريكية سكاكر الغلوكوز واللاكتوز والسكروز ليصبح الوسط حمضي ويتغير لون كاشف الفينول إلى الأصفر ويكون لون الجزء القائم والمائل من المنبت أصفر



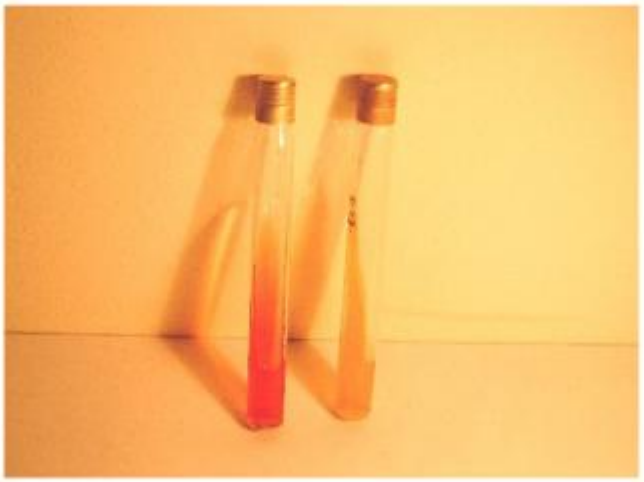
منبت TSI مقارنة في نتيجة النمو بين السالمونيلا (في يمين المنبت) والإشريكية (في يسار المنبت)



٤- منبت آجار الحديد لكليجلر :

يشبه هذا المنبت المنبت السابق في تركيبه (إلا أنه لا يحتوي سوى سكرين فقط هما الجلوكوز واللاكتوز) و كذلك في نتيجة النمو (لون أصفر لكامل المنبت)

منبت كليجلر قبل وبعد نمو الإشريكية القولونية عليه



المقاومة للعوامل الفيزيائية والكيميائية

١- جراثيم حساسة نسبياً للعوامل الفيزيائية والكيمائية تموت بالدرجة ٦٠ د خلال ٢٠ دقيقة

٢- تبقى حية بالماء والزرق وغبار الحظائر لعدة أسابيع أو أشهر ويقل تأثير المطهرات عليها عندما تكون مغمورة بالمخاط والزرق .

البنية المستضدية للإشريكية :

تملك الإشريكية مستضدات مختلفة تقسم إلى

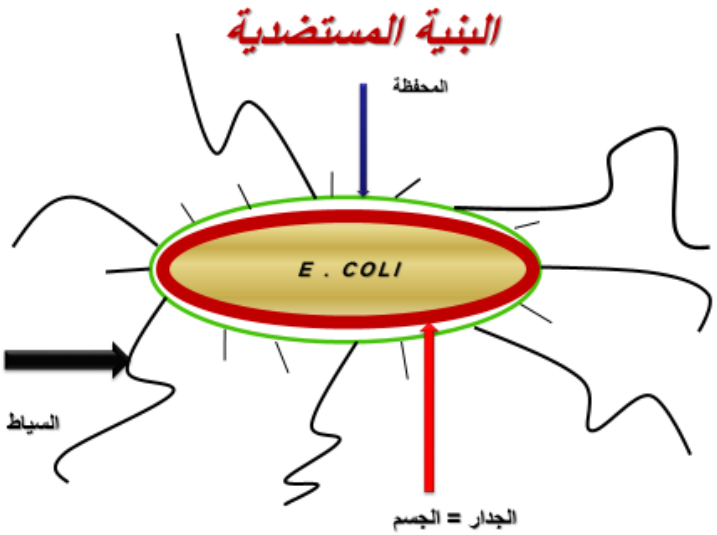
١- **مستضدات محفظية (K):** يقع المستضد المحفظي فوق المستضد الجسدي(O) ولهذا المستضد دور في مساعدة الجرثوم في تشكيل مستعمرات على مخاطية الأمعاء وذلك من خلال حماية الجرثوم من عملية البلعمة وتأثير المتممة .

٢- **مستضدات جسدية (O) :** يوجد في الغشاء الخارجي لجدار الخلية الجرثومية لا يتلف المستضد الجسدي بتأثير الكحول ولا يتخرب من التسخين بالدرجة ١٠٠ م.

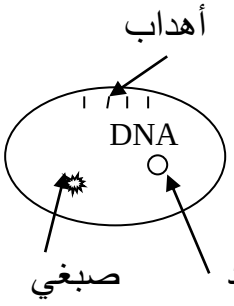
٣- **مستضدات سوطية (H) :** تكون قليلة في الجراثيم المعزولة حديثاً ويؤدي تكرار الزرع في المنابت نصف الصلبة إلى زيادة تشكيل المستضد السوطي وإلى تنشيط حركة الجرثوم .

ملاحظة :

تمتلك الإشريكية القولونية مستضدات مختلفة وقد صنف هذا الجرثوم إلى أنماط مصلية حسب أنواع هذه المستضدات الثلاثة حيث تحدد أنواع هذه المستضدات عند التنميط المصلي E.coli مثل النمط المصلي H19:K58:O167



البلازميد



هي عبارة عن جزء من DNA متوضعة في الهيولى خارج الصبغيات قادرة على الأنتقال من خلية إلى أخرى ويوجد البلازميد في ذراري الإشريكية الممرضة والمولدة للذيفان المعوي

وتتواجد على البلازميدات مورثات تتحكم بـ

١- زيادة الفوعة من خلال تشكيل مستضدات مخملية (أهداب) وتشكيل ذيفانات معوية

٢- مقاومة الجراثيم الصادات الحيوية : حيث تقوم بنقل المقاومة للصادات الحيوية من خلية جرثومية لأخرى

عوامل الفوعة في ذراري الإشريكية

١- **المستضد المحفظي :** تحمي الجرثوم من عملية البلعمة

٢- **الذيفان الداخلي:** يوجد هذا الذيفان في جدار الخلية الجرثومية و يخرج عند موت وتحلل الخلية الجرثومية .

٣- **الخمل :** وهي الأهداب التي تساعد في التثبت على الخلايا الظهارية المعوية وبذلك تقاوم الجراثيم عملية التمعج المعوي ولا تساق إلى الأمعاء الغليظة التي لا تتأثر خلاياها بالذيفان المعوي الجرثومي وتبقى ملتصقة على خلايا االصائم واللفائفي الحساسة جدا لتأثير هذا الذيفان .

٤- **الذيفان المعوي:** يوجد عند الجراثيم التي تملك البلازميد وله نوعان أحدهما حساس للحرارة (IT) والآخر مقاوم للحرارة (ST) .

٥- **الذيفان السام لخلايا فيرو** (خلايا كلية الجنين عند القرد)

٦- **الهيمولايزين** (الحال لكريات الدم الحمراء) .

تشخيص العصيات القولونية

١- العينات : تأخذ من(الأكياس الهوائية – الكبد – الأغشية الزلالية - مناطق الإصابة)

٢- الزرع : تزرع العينات على المنابت التميزية للإشريكية مثل منبت ماكونكي بدرجة٣٧ لمدة ٢٤ ساعة

٣- الفحص المجهري تؤخذ مسحة من المنبت وتصبغ بصبغة غرام وتفحص بصبغة غرام

٤- اختبارات بيوكيميائية : تخمر E.coli سكاكر الغلوكوز واللاكتوز والسكروز فتزرع على منبت كليجلر أو الحديد ثلاثي السكر

٥- تحديد النمط المصلي من خلال تحديد نمط المستضد المحفظي K أو O أو H

نهاية البحث الثاني

المطثيات (الكلوستريديوم)

جنس المطثيات: جنس العصيات اللاهوائية المتبوغة (الكلوستريريوم)

الخواص العامة

المطثيات جراثيم إيجابية الغرام تسبب العديد من الأمراض للإنسان والحيوان وتوجد بشكلين بعضها يحلل البروتين وبعضها يفرز الذيفانات الخارجية وبعضا يتمتع بالخاصتين معاً

وتتميز هذه الجراثيم بقدرتها على التبوغ بحيث تصبح شديدة المقاومة للعوامل الفيزيائية والكيميائية المحيطة بها ويكون حجم البوغ أكبر من العصية الأم

تعيش معظم أفراد هذا الجنس في التربة وبراز الإنسان وروث الحيوان والجسس

أنواع المطثيات

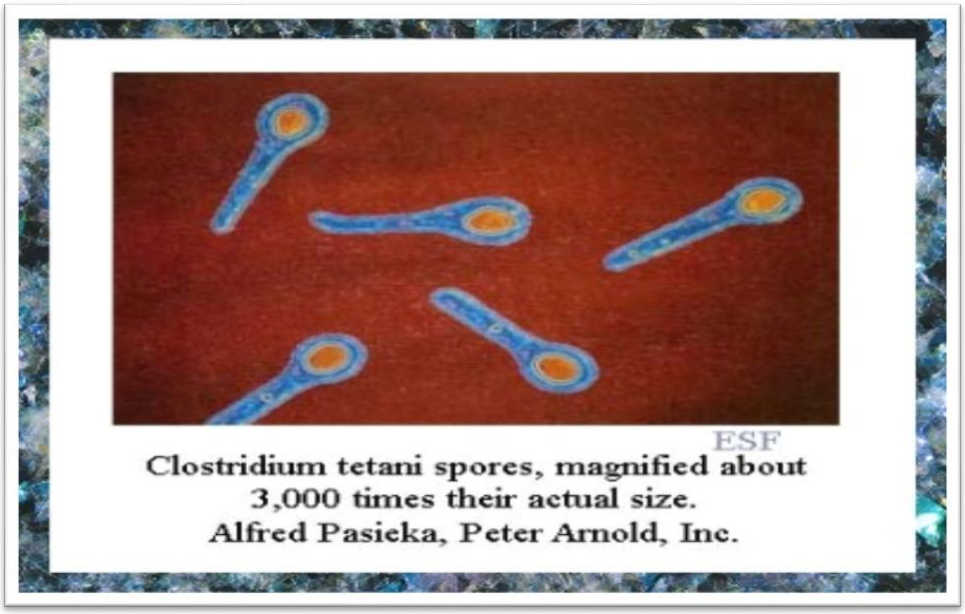
١- المطثيات الكزازية: تسبب الكزاز الذي يصب الإنسان والحيوانات الكبيرة والكلاب وتتميز بإصابة العضلات الإرادية بتشنجات بفعل الذيفان الخارجي

٢- المطثية بيرفرنجنس: تصيب الدجاج وتسبب التهاب الأمعاء النخري

٣- المطثية الحاطمة: تصيب الأغنام والحملان

٤- المطثية شوفاي (عصيات التفحم العضلي): تصيب الأغنام والماعز والعجول

المطثية الكزازية لاحظ شكل عصا الطبلة



- كلوستريديوم بيرفرنجنس

تسبب التهاب الأمعاء النخري عند الطيور ويتميز بتنخر الطبقة المخاطية في الأمعاء ولها صنفان (C-A) تتواجد هذه الجراثيم بشكل طبيعي في أمعاء الطائر وخصوصاً الصنف A وهذه الجراثيم قادرة على إفراز السموم التي تسبب موت خلايا بطانة الأمعاء ، تترافق الإصابة مع بعض الأمراض الأخرى مثل الكوكسيديا والتي تزيد كمية البروتينات في لمعة الأمعاء مما يهيئ بيئة مناسبة لتكاثر المطثيات.

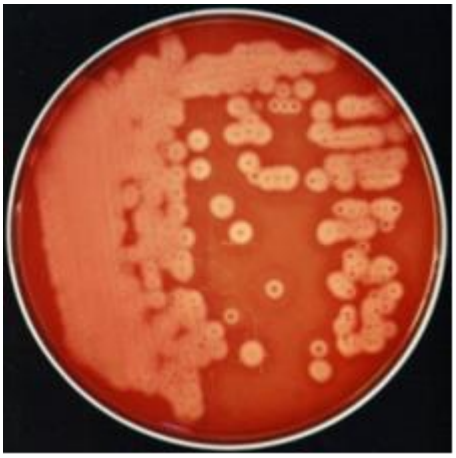
الخواص الشكلية والتلوينية:

جراثيم إيجابية الغرام تكون بشكل عصيات متبوغة والبوغ يأخذ حجم أكبر من حجم العصية

الخواص المزرعية:

منابت الإكثار : من أهم المنابت التي تستخدم لإكثار المطثيات هو منبت ثيوغليكولات ويفضل تسخين المنبت للدرجة ٨٠ مئوية بعد وضع العينة في المنبت حيث أن ذلك يساعد على قتل الجراثيم المصاحبة.

تنمو في المزارع التي يكون بها نسبة الأوكسجين قليل أو معدوم حيث تنمو على الآجار المدمى وتشكل بعد ١٥ ساعة من زرعها تخلل للدم .



منبت آجار مدمى يظهر عليه التحلل الدموي بمنطقتين

-اختبارات الكيميا حيوية :

المطثية الحاطمة مخمرة للسكريات (الغلوكوز، السكروز، اللاكتوز، المالتوز)، سالبة للكتاليز catalase و الأوكسيديز oxidase و الاندول Indole، وأنزيم الليبيز lipase. تحلل اللستين lecithinase activity على وسط أغار مح البيض egg yolk agar فتنتج تلألؤ opalescent change أو منطقة صافية حول المستعمرات النامية بسبب الفعل الأنزيمي على اللستين lecithin الموجود في الوسط.

المطثية الحاطمة المحقونة Inoculation في وسط حليب اللتموس Litmus milk medium تنتج خثره عاصفة (Stormy clot) أو تسمى تفاعل التخمر العاصف Stormy fermentation reaction. اللاكتوز في الوسط يخمر Fermented بالمطثية الحاطمة منتجة حمض Acid مع تخثر أو تجلط Coagulates بروتين الكازيئين Casein و تحفز أو تسبب تغير اللون من الأزرق إلى الوردي (كاشف حبيبات اللتموس Litmus PH Indicater). الخثرة الحامضية بعد ذلك تتكسر أو تتحطم بسبب تكوين الغاز Gas Formation الناتج عن التخمر.

إفراز السموم : كلا الصنفين(C-A) قادر على إفراز السموم و الذيفانات المسؤولة على ظهور الأعراض السريرية والآفات في الأنسجة

أنواع السموم

١- ألفا توكسين (C-A) يفرزه الصنفين معاً

٢- بيتا توكسين(C) يفرزه الصنف C وهذا الذيفان هو المسؤول عن تنخر مخاطية الأمعاء

٣- ذيفان نت ب NetB toxin.

التشخيص المخبري

١- إجراء مسحة من سطح الأمعاء المصابة وصبغها بصبغة غرام مع ملاحظة ظهور أعداد كبيرة من المطثيات إيجابية الغرام (تؤخذ العينة من الصائم أو اللفائفي حصراً دون الأعورين)

٢- أخذ عينة من الأمعاء وزرعها على منبت الآجار المدمى وملاحظة خاصة التحلل الدموي

٤- يمكن تشخيصها عن طريق اختبار الإيليزا لتحديد النمط المصلي.

جنس الباستوريلا

تتواجد هذه الجراثيم بشكل متعايش على المسالك العليا من الجهاز التنفسي والرئة ويرتبط حدوث هذا المرض بهذه الجراثيم بحدوث عوامل مهيئة (نقص التغذية- الإجهاد – نقص فيتامينA- البرد- ارتفاع درجة الرطوبة)

ينتمي إلى هذا الجنس (الباستوريلا متعددة النفوق- الباستوريلا محللة الدم – الباستوريلا الرئوية الاستوائية)

تتميز هذه الجراثيم بأنها سلبية الغرام وتأخذ الشكل ثنائي القطبين لأن تركيز الهيولى يكون أعلى في القطبين فهي جراثيم غير متحركة هوائية أو لا هوائية مخيرة

-عصيات الباستوريلا متعددة النفوق : تسبب مرض كوليرا الطيور

الخواص الشكلية والتلوينية :

هي جراثيم سلبية الغرام لها محفظة غير متحركة ، في المحضرات المأخوذة من الدم أو الأعضاء تظهر خاصية ذات القطبين

وذلك عند صبغها بصبغة أزرق الميتيلين للوفلر أو صبغة جيمسا أو ليشمان وهي جراثيم غير متبوغة

الخواص المزرعية:

جراثيم هوائية أو لا هوائية مخيرة تحتاج إلى منابت غنية تحتوي المصل والدم وبشكل عام تنمو الباستوريلا على المنابت معطية أحد الأشكال التالية:

١- الشكل الناعم : مستعمرات ناعمة متوسطة الحجم أطرافها كاملة الاستدارة ذات لمعة زرقاء متألقة ثم يصبح لونها بيضاء معتمة

٢- الشكل المخاطي : مستعمرات مخاطية القوام كبيرة الحجم لونها مائل للازرقاق لامعة شفافة تحتوي في تركيبها على حمض الهيالورونيك

٣- الشكل الخشن : مستعمرات خشنة زرقاء اللون غير لامعة ويظهر هذا اللون غالباً في المزارع القديمة

التشخيص المخبري :

يعتبر من الضروري إجراء التشخيص المخبري بسبب تشابه الأعراض السريرية عند الإصابة بعصيات الباستوريلا مع الكثير من الأمراض الأخرى لذلك نلجأ إلى ما يلي :

١- تحضير شرائح من الأعضاء (رئة- قلب- كبد- طحال) أو من الدم وتلوينها بصبغة أزرق الميتيلين للوفلر وملاحظة خاصية ثنائية القطبين لهذه العصيات

٢- إجراء الزرع من الأعضاء السابقة على منابت غنية بالدم أو المصل حيث تنمو الباستوريلا بإحدى أشكالها الثلاث مع ملاحظة خاصية عدم الانحلال الدموي

٣- إجراء اختبارات الكيمياء الحيوية

٤- إجراء الاختبارات المصلية وذلك للكشف عن الأضداد ومعيارها (تركيزها) في الدم مثل (اختبار التراص الدموي الغير مباشر – اختبار التعادل أو الحماية في الفئران)

٥- الحقن في حيوانات التجارب للكشف عن فوعة العصيات المعزولة.

عائلة المكورات الدقيقة

الخواص العامة :

تضم هذه العائلة جراثيم إيجابية الغرام مكورة الشكل تتواجد كجراثيم متعايشة على سطح الجلد عند الإنسان والحيوان وفي الهواء والماء والتربة ولها القدرة على النمو في منابت تحتوي على ملح الطعام بنسبة عالية من الملح تصل إلى ٢٠ % ، تضم هذه العائلة أجناس متعددة منها :

- ✓ جنس العنقودية Genus staphylococcus .
- ✓ جنس المكيرة Genus Micrococcus .
- ✓ جنس المكورات الفموية Genus Stomatococcus .
- ✓ جنس المكورات السطحية Genus Planococcus .

و أهم هذه الأجناس هو جنس العنقودية :

جنس المكورات العنقودية (Genus Staghylococcus)

تنتشر المكورات العنقودية في كل مكان وتتواجد على الجلد والأغشية المخاطية وخصوصاً الجزء العلوي من الجهاز التنفسي ، تنظم أفراد هذا الجنس على شكل عناقيد إلا أن هذا ليس بقاعدة عامة فقط بالمسحات المأخوذة من منابت صلبة، وتعتبر العنقوديات هي المسبب الرئيسي لعملية التقيح وذلك في مستوى الجلد والأغشية المخاطية والأعضاء الداخلية وكذلك تسبب الإنتان الدموي (وجود الجراثيم أو سمومها في الدم)

ويوجد ضمن هذا الجنس عدة أنواع من الجراثيم تعتمد في تصنيفها على أساس اختبار عامل التلازن أو اختبار عامل التخثر ومن الأنواع المخثرة هي (العنقودية الذهبية – العنقودية هيكس) ومن الأنواع غير المخثرة للبلازما (العنقودية البشروية) .

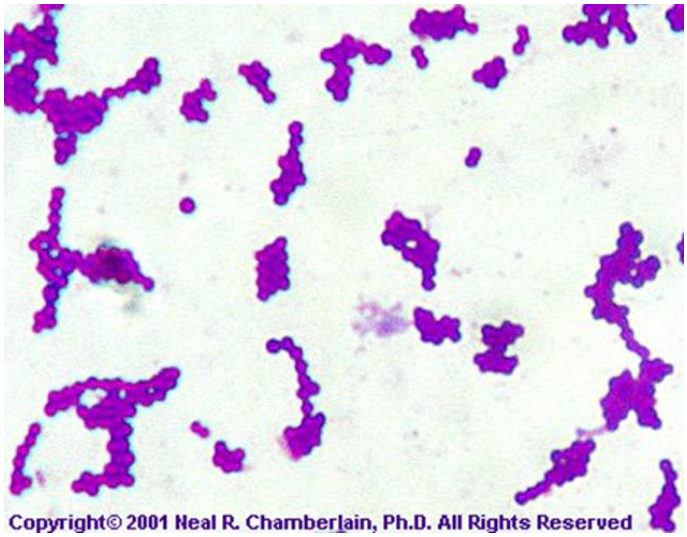
العنقودية الذهبية :

تسبب هذه الجراثيم تقيحات وخراجات عند الإنسان والحيوان وتسبب الانتان الدموي ، فهي تصيب **الخيول** وتسبب داء الفطر العنقودي وتصيب **الأبقار** وتسبب التهاب الضرع والرحم وتصيب **الدواجن** وتسبب التهاب العظام والمفاصل

وقد وجد أنها يمكن أن تصيب **الإنسان** وتسبب تسمم معوي فقد وجد أن معظم حالات التسمم المعوي هو بسبب تلوث لحوم الدواجن أثناء الذبح وليس لكون الدجاج حاملاً لهذه الجرثومة

الخواص الشكلية والتلوينية :

العنقودية الذهبية عبارة عن مكورات إيجابية الغرام تتنظم على شكل عناقيد العنب خاصة في المسحات المأخوذة من منابت صلبة أما في المسحات المأخوذة من المنابت السائلة تتنظم على شكل ثنائي أو كتل أو سلاسل صغيرة تشبه المكورات العقدية وهي



غير متحركة

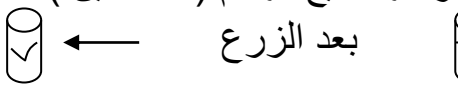
مكورات عنقودية

الخواص المزرعية :

هوائية أو لا هوائية مخيرة تتميز أنها تنمو في الأوساط التي تحتوي على نسبة عالية من الملح ومن منابتها

١- الآجار المغذي : مستعمرات يكون لونها أبيض ثم تتحول إلى لون ذهبي أو ليموني حيث تفرز هذه المستعمرات أصبغة ذهبية صفراء تبقى داخل المستعمرة

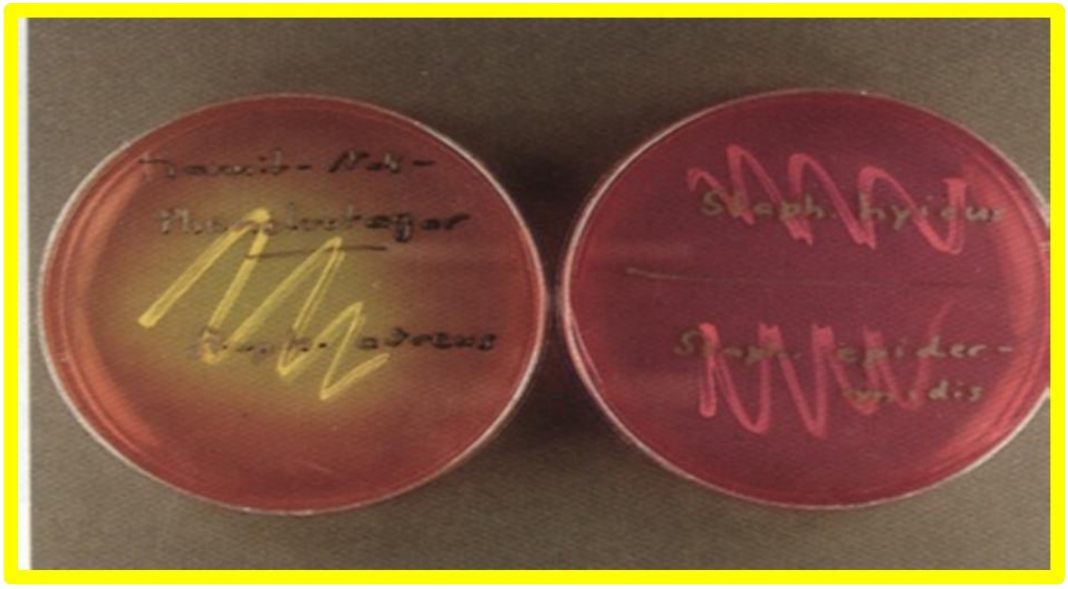
٢- منبت الجلاتين: تنمو بدرجة حرارة ١٨ م وتمتاز أنها تميع الهلام (الجلاتين) معطية شكل القمع



٣- منبت شابمان : يتميز أنه من المنابت التي تستخدم لعزل العنقودية الذهبية عن باقي أنواع الجراثيم حيث أنه يحتوي على ملح الطعام بنسبة ٧% .

٤- منبت الآجار الدموي : تحدث المكورات نوعين من الانحلال الدموي :
انحلال دموي كامل : تحيط بالمستعمرات مناطق شفافة خالية تماما من كريات الدم الحمراء

انحلال دموي غير كامل : تحيط بالمستعمرات منطقة نصف شفافة نتيجة الانحلال الدموي غير الكامل .



العنقودية الذهبية والعنقودية البشروية – بيئة شابمان –
مستعمرات العنقودية الذهبية صفراء اللون نتيجة تخمير سكر المانيتول،
على عكس العنقودية البشروية التي لا تخمر سكر المانيتول

إفرازات العنقودية الذهبية

١- عامل التخثر

الذي يستخدم للتميز بين الجراثيم الممرضة وغير الممرضة وبتأثير هذا العامل يتحول الفبرينوجين إلى فبرين وتظهر خاصية التخثر

طريقة الاختبار :
نحضر ٠,٥ مل من دم الإنسان مضاف إليه السترات وقطرة من مزروع المرق المغذي ويحضن في حمام مائي بدرجة ٣٧ م مدة ٢- ٣ ساعة فإذا لاحظنا وجود تخثر كانت الجراثيم ممرضة وإذا لم نلاحظ التخثر كانت الجراثيم غير ممرضة .

٢- عامل التلازن

يتوضع هذا العامل على جدار الخلية الجرثومية حيث يتفاعل مباشرة مع الفبرينوجين وتتلازن العنقودية في البلازما (المصل)

٣- الذيفان المعوي

٤- الذيفان العنقودي

٥- الخميرة الحالة للكريات الحمراء

٦- الخميرة القاتلة للكريات البيضاء

٧- خميرة الحالة لحمض الهيالورونيك

٨- الخميرة الحالة للفبرين

التشخيص المخبري :

يعتمد التشخيص لمرض التهاب المفاصل والعظام عند الدواجن المتسبب بالمكورات العنقودية على عزل وتشخيص المسبب لأن الكثير من الجراثيم تسبب هذه الحالات مثل الأشريكية والمايكوبلازما وغيرها ومعظمها تسبب إصابات موضعية للمفاصل لذلك تتبع الخطوات التالية بهدف وضع التشخيص السليم :

١- ترسل العينات اللازمة إلى المخبر ويبدأ التحري عن العنقوديات بتحضير مسحات من محتوى القيح ومن ثم صباغتها بصبغة غرام وفحصها مجهريا .

٢- الزرع والعزل : يزرع على الآجار الدموي لملاحظة الخواص المزرعية للمستعمرات النامية وخاصية الانحلال الدموي ونوعه وكذلك يلجأ إلى الزرع على البيئة التمييزية (شابمان) التي تحتوي على نسبة عالية من ملح الطعام ومن ملاحظة خاصية تخمر سكر المانيتول .

٣- إجراء اختبار المخثراز : للتأكد من كون المستعمرات المعزولة هي فعلا مستعمرات العنقودية الذهبية .

٤- إجراء اختبارت الكيمياالحيوية

٥- الكشف عن عامل التلازن Clumping factor : حيث تؤخذ شريحة زجاجية وتوضع عليها في منطقتين قطرة من بلازما الدم ويوضع على إحدى النقطتين كمية من مستعمرات المكورات المعزولة المشتبه بها ففي الحالة الايجابية اي عند وجود عامل التلازن يلاحظ في القطرة الحاوية على المستعمرات حدوث تلازن للمكورات العقودية خلال دقيقتين .

المفطورات (المايكوبلازما)

هي جراثيم تتواجد بشكل حر في الطبيعة ولها نوعان فبعضها يعيش بشكل رمي أي على بقايا النبات والحيوان والبعض الأخر بشكل ممرض للإنسان والحيوان والطيور

والمفطورات هي أبسط أنواع الجراثيم التي تستطيع العيش بصورة طليقة ، وهي أصغر الكائنات الجرثومية التي تستطيع التكاثر بطريقة ذاتية ولا تحتاج لمنابت خلوية ونتيجةً لصغر حجمها فهي تستطيع المرور عبر المرشحات الجرثومية وتتميز أن ليس لها جدار خلوي وبالتالي لا تتأثر بالبنسلين كما أنها لا تتأثر ببنفسجية الكريستال وأزرق الميتيلين لذلك تضاف هذه المواد إلى منابت المايكوبلازما لمنع نمو الجراثيم المصاحبة وبالتالي فأن

أهم ما يميز المفطورات عن باقي الجراثيم

١- حجمها الصغير

٢- مرورها عبر المرشحات الجرثومية

٣- فقدان الجدار الخلوي

س: ما أوجه التشابه و الاختلاف بين الفيروسات والمفطورات ؟

١- تتشابه مع الفيروسات بجهازها الأنزيمي الضعيف ولكن تتميز عن الفيروسات بأنها لا تحتاج إلى منابت خلوية لتكاثرها (أي تتكاثر خارج الخلايا)

٢- تحتوي معاً على الحمضيين النوويين DNA –RNA

أهم أنواع المايكوبلازما التي تصيب الدواجن

١- مايكوبلازما جاليستيكم : يسبب التهاب الأكياس الهوائية

٢- مايكوبلازما سينوفي : يسبب التهاب المفاصل

النوع الأول من المايكوبلازما + E coli يسببان المرض التنفسي المزمن CRD

كما أن العنقودية الذهبية تسبب التهاب المفاصل

الأصناف	المرض
الدواجن	
م.غاليسيبتيكم	الدجاج: المرض التنفسي المزمن الحبش :التهاب الجيوب المعدي
م.سينوفي	الدجاج و الحبش:التهاب الأغشية الزليلية
م.ميليغريدس	الحبش التهاب الأكياس والجيوب الهوائية في الطيور الصغيرة
م.أيوا	الحبش الإعاقة وعاهات الأرجل ونسبة موت عالية في أجنة الحبش
م.أناتيس	البط التهاب الجيوب المعدي
الخنازير	
م.هيورينيس	التهاب المفاصل التقدم المزمن والتهاب الأغشية المصلية المتعدد
م.هيوسينوفي	التهاب المفاصل المتعدد في عمر ١٢-٢٤
م.هيوبينومنيا	التهاب الرئة المستوطن
الأبقار	
م.ميكوئيدس تحت النوع ميكوئيدس (مستعمرة صغيرة)	التهاب الرئة وذات الجنب المستوطن
م.بوفيس	التهابات الضرع والمفاصل والرئة والطرق التناسلية والإجهاض
م.بوفي جيناتيليم	التهابات المهبل و الضرع والمفاصل و الأوعية الدموية المؤثر
اليوريا بلازما	التهاب الفرج والمهبل والتهاب الرئة

م.ديسبر	التهاب الرئة في العجول
م. كاليفورنيكم	التهاب الضرع
م.كانادينيس	التهاب الضرع
م.ميكونيدس تحت النوع ميكونيدس (مستعمرة كبيرة)	تسمم دموي التهاب المفاصل المتعدد التهاب الضرع التهاب الرئة التهاب الملتحمة
العترة F38	التهاب الرئة وذات الجنب المعدي
م. باتيرفاسينيس	التهاب الضرع التهاب المفاصل
الأغنام	
م.اوفي بينومينيا	التهاب الرئة
الماعز والأغنام	
م. الأجلكتية	الأجلكتية المعدية
م.كونجينكتيفة	التهاب الملتحمة القرني

م.كابريكولم	التهاب الضرع التهاب المفاصل التهاب الرئة
أكوبلازما أوكيلي	التهاب الملتحمة القرني
الخيول	
م.فيليس	ذات الجنب
الكلاب	
م.سينوس	التهاب الرئة
القطط	
م.فيليس	التهاب الملتحمة
الجرذان والفئران	
م.نيروليتيكم	مرض رولينغ

الخواص الشكلية والتلوينية

باعتبار هذه الجراثيم ليس لها جدار خلوي فإنه من الصعب تحديد شكلها فيتوقف ذلك على نوع المنبت ففي المنابت الصلبة تكون كروية الشكل وفي المنابت السائلة تكون بشكل خيوط رفيعة ونتيجةً لصغر حجمها فيصعب رؤيتها بالمجهر الضوئي العادي ويلزم لرؤيتها

المجهر الالكتروني ، وهي جراثيم سلبية الغرام وتلوينها بصبغة غرام صعب لذلك نلون كامل المستعمرة بصبغة جيمسا ، وهي جراثيم غير متحركة ليس لها سياط ولا أهداب وهي جراثيم غير متبوغة

الخواص المزرعية

نتيجة فقدان جهازها الأنزيمي الكامل فهي لا تستطيع النمو على المنابت العادية ولا تنمو إلا على المنابت الغنية بمصل الدم (مصل دم الخنازير أو الدواجن أو الخيول)وبنسبة مصل الدم من ١٠ – ١٥ % وقد تصل حتى ٤٠% ويضاف أيضاً إلى منابت المايكوبلازما مواد تمنع نمو الجراثيم المصاحبة مثل البنسلين أو بنفسجية الكريستال أو أزرق الميتيلين ، والبعض من أنواع المفطورات يحتاج في نموه إلى CO2 بنسبة ٥% ويتميز هذا النوع من الجراثيم بأنها بطيئة النمو

وبعد حضانة ١ – ٧ أيام تظهر المستعمرات دقيقة وناعمة كالدبوس تنغرس داخل المنبت وعند التكبير يلاحظ شكل المستعمرات يشبه شكل البيض المقلي حيث تكون المستعمرة مرتفعة المركز ذات لون غامق (بسبب كثافة المفطورات) وباتجاه الأطراف

ويلاحظ أن شكل المستعمرات يشبه شكل البيض المقلي

التشخيص المخبري

تتشابه أعراض المرض الذي تسببه المايكوبلازما مع العديد من الأمراض التنفسية الأخرى عند الدواجن مثل النيوكاسل والبرونشتيد وغيرها لذلك لابد من عزل المسبب وإجراء الاختبارات المصلية لتحديد العامل المسبب بدقة وأبسط هذه الاختبارات المصلية هو اختبار التراص المصلي السريع على الشريحة

مبدأ الاختبار : يوضع على شريحة زجاجية نظيفة قطرة من المصل أو الدم ويضاف لها قطرة من المستضد (قطرة من جراثيم المايكوبلازما) وتمزج القطرة وتقرأ النتيجة خلال ١-٢ دقيقة والنتيجة هي إما وجود تكتلات أو عدم وجودها إلا أن هذا الاختبار لا يعطي نتيجة دقيقة ١٠٠% أنما هو اختبار أولي لا يعتمد عليه لوحده في الحكم على قطيع بأنه مصاب أو سليم من المايكوبلازما ، وعندما تكون النتيجة إيجابية في هذا الاختبار يجب المتابعة بالاختبارات المصلية الأخرى

علم الفيروسات (علم الحمات)

عبارة عن جسيمات ممرضة متناهية في الصغر تبلغ أبعادها ٢٠ – ٣٠ نانو متر وتمر عبر المرشحات المعيقة لمرور الجراثيم ولا ترى بالمجهر الضوئي العادي وتتميز عن غيرها من الكائنات الحية المجهرية بـ

١- تحوي على أحد الحمضين النوويين DNA – RNA ولا تحتوي الاثنين معاً

٢- تتميز الفيروسات بأنها غير قادرة على التكاثر الذاتي وإنما هي مجبرة على التكاثر داخل الخلية وذلك لسببين

a- لافتقارها للأنزيمات الضرورية لعملية الأستقلاب

b- لأنها لا تمتلك ريباسات لذلك فهي غير قادرة على تكوين بروتيناتها الخاصة

٣- لا تنمو الفيروسات في المنابت المغذية الاصطناعية وإنما فقط في الأوساط الحاوية على خلايا حية

تصنيف الفيروسات

يتم تصنيف الفيروسات بالاعتماد على عدة نقاط مختلفة وأهمها

١- مجموعة الفيروسات الحاوية على الحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسجين DNA مثل عائلة حمات الجدري

٢- مجموعة الفيروسات الحاوية على الحمض النووي الريبي RNA مثل عائلة حمات البيرنا

ويؤخذ أيضاً خلال التصنيف بعين الاعتبار عدة نقاط منها (تركيب وشكل القفيصة النووية – تركيب الغلاف [حسب نسبة البروتين في الغلاف] – عدد سلاسل الحمض النووي)

بنية الفيروسات

الحمض النووي (اللب) : يحيط به القفيصة وتتألف القفيصة من وحدات تدعى كابسو ميرات والقفيصة والحمض النووي مع بعضهما تسميان القفيصة النووية ، وتحاط القفيصة بطبقة من البروتينات والشحوم والسكريات تدعى الغلاف

عائلة البيرنا

تضم هذه العائلة أجناساً متعددة أهمها جنس فيروسات بيرنا الطيرية وينتمي لهذا الجنس فيروس الجمبورو المسبب لمرض الجمبورو عند الطيور

مرض الجمبورو (مرض التهاب الجراب المعوي) (IBD)

وهو مرض فيروسي يصيب الدواجن الفتية غير البالغة بعمر ٣- ٦ أسابيع ويؤدي إلى نسبة نفوق مرتفعة وإلى تثبيط مناعي شديد حيث يخرب الفيروس الخلايا المناعية البائية B المسؤولة عن تشكيل الأضداد

صفات فيروس الجمبورو :

من جنس البيرنا وعائلة فيروسات البيرنا وهي عبارة عن فيروسات عارية (غير مغلفة) تحتوي على سلسلتين من الـ RNA وهو مقاوم لدرجات الحرارة ٥٦° لمدة ٥ ساعة وهو مقاوم للأيتر والكلوروفورم وللفورمالين والفينول في التراكيز القليلة لعدة ساعات

تصنيف فيروسات الجمبورو

تصنف إلى نمطين مصليين

١- نمط مصلي /١/ : وهو الذي يصيب الدجاج ويسبب المرض

٢- نمط مصلي /٢/ عزلت هذه الفيروسات من الدجاج دون أن تسبب أية أعراض للمرض.

الجلسة العملية الأولى

التعقيم والتطهير

التعقيم

هو إتلاف كافة الأحياء الدقيقة الممرضة وغير الممرضة بكافة أشكالها (جراثيم – أبواغ – فطور –حمات) والتي يمكن أن تتواجد على الأدوات أو الأوساط الزرعية المستخدمة في دراسة الجراثيم
وذلك باستخدام طرق فيزيائية الحرارة والإشعاعات والترشيح والذبذبات فوق الصوتية) أو وطرق كيميائية (غازات قاتلة ومحاليل مطهرة).

التطهير

القضاء على الشكل الإنباتي للجراثيم وليس للأبواغ وتستخدم فيه عادة مواد كيميائية والتي تعمل على تأخير أو عرقلة النمو الجرثومي
تختلف آلية التعقيم باختلاف المادة المراد تعقيمها

وتصنف الميكروبات من (الأقل مقاومة إلى الأكثر مقاومة) كما يلي :

١. جراثيم منتشة
٢. فطريات
٣. فيروسات مغلفة
٤. جراثيم السل
٥. فيروسات غير مغلفة
٦. جراثيم متبوغة
٧. حويصيلات طفيليات أحادية الخلية (oocyst)

نسبة إبادة الميكروبات بالطرق المختلفة :

التعقيم Sterilization يبيد ١٠٠% من الجراثيم

و التطهير Disinfection فيبيد حتى ٩٩% من الجراثيم

اما التنظيف Cleaning فيقضى على الجراثيم بدرجات مختلفة

أولاً – التعقيم باستخدام الطرق الفيزيائية :

A- **التعقيم بالحرارة الجافة** (الإحماء والتلهيب– الهواء الساخن)

الجراثيم حساسة للحرارة اذ ان معظمها يموت بين (٥٥ – ٨٠) درجة مئوية ، و لكن الأبواغ تبقى و قد تتحمل عدة ساعات من الغليان لذلك يجب ان تكون الحرارة مرتفعة الى (١٧٠ –

١٨٠) درجة مئوية بالحرارة الجافة والى (١٢٠) درجة و مئوية بالحرارة الرطبة حتى تتم الابادة الكاملة للجراثيم و بما فيها الأبواغ.

١- **الإحماء والتلهيب** أبسط أنواع التعقيم

الإحماء:

وضع المادة المراد تعقيمها في اللهب مباشرة حتى درجة الاحمرار
تعقم بهذه الطريقة أدوات الزرع الجرثومي والإبر وبعض الآلات المعدنية
ملاحظة : بعض الأدوات المعقمة بهذه الطريقة (مثل لوب الزرع الجرثومي) : لا تستخدم في الزرع الجرثومي إلا بعد أن تبرد ، ويجب إعادة تعقيمها بعد كل استعمال .

التلهيب :

تمرير المادة المراد تعقيمها على اللهب عدة مرات بحركات معتدلة السرعة
تعقم بهذه الطريقة فوهات الأنابيب و الأوعية الزجاجية قبل استخدامها .
وقد يستخدم ايضا في حرق الجثث النافقة

٢- **التعقيم في الهواء الساخن :** (فرن باستور أو فرن الهواء الساخن)

عبارة عن جهاز مزدوج الجدار يحتوي على معادن مقاومتها الكهربائية عالية حيث ترتفع درجة حرارتها بشكل كبير عند مرور التيار الكهربائي فيها وكما يحتوي على منظم حراري للتحكم بدرجة الحرارة وعلى مؤقت زمني

مبدأ عمله : رفع درجة حرارة الهواء الموجود في الفرن إلى ١٨٠ درجة مئوية مدة ١/٢ ساعة (يبدأ الوقت بالتناقص اعتبارا من لحظة وصول الحرارة داخل الفرن إلى الدرجة المطلوبة) ثم يترك الجهاز ليبرد تماما .

يستخدم في تعقيم البودرات و السوائل الغير مائية مثل البرافين والفازلين و الأدوات الجراحية ،و يمكن تعقيم الأدوات الجراحية الحساسة عند درجة حرارة (١٣٥-١٥٠) مئوية لمدة ساعة و نصف.

B- التعقيم بالحرارة الرطبة :

١- **الغلي :** من الطرق التقليدية للتعقيم

توضع الأدوات في وعاء يحتوي على الماء يغلى على الدرجة ١٠٠ مئوية مدة (١٥-٣٠) دقيقة ، إن الغليان لدرجة ١٠٠ يقتل الكثير من الجراثيم والحمات والفطور خلال ١٠ دقائق ولكن الأبواغ وبعض الحمات لا تموت خلال هذه الفترة القصيرة (وجد أن الأبواغ تقاوم الغليان مدة ٢٠ ساعة).

تعقم بهذه الطريقة الإبر والملاقط والمشارط والسدادات المطاطية والمحاقن ،ويمكن إضافة بيكربونات الصوديوم بتركيز ١-٢% بغية (زيادة فعالية التعقيم ،وحماية الأدوات المعدنية من الصدأ) .

٢- **التعقيم ببخار الماء والضغط** (جهاز الموصدة–اوتوكلافAutoclave) :

إن التعرض للبخار لمدة ٩٠ دقيقة يقتل الجراثيم المنتشة وليس الأبواغ و لذلك فالتعقيم غير كامل اما عند التعرض لبخار الماء تحت ضغط فيؤدي ذلك الى تعقيما كاملا

تختلف درجة حرارة البخار بحسب درجة غليان الماء الناتج عنه وكلما ازداد الضغط الجوي فوق سطح الماء ازداد الحد الذي يصبح فيه الماء قادر على الغليان وهذا يؤدي لازدياد درجة حرارة بخار الماء الناتج ،في الضغط الجوي الاعتيادي يغلي الماء على الرجة ١٠٠ م وعند ازدياد الضغط بمقدار ضغط جوي واحد فوق سطح الماء (ترتفع درجة غليان الماء إلى ١٢١ درجة مئوية) وعندما يزداد الضغط بمقدار ٢ ضغط جوي (ترتفع درجة الغليان إلى ١٣٥ درجة مئوية)

إن ضغط جوي ١ لبخار الماء (١٢١ درجة مئوية) مدة ١٥ دقيقة كافية للقضاء على الجراثيم وأبواغها ويفضل إطالة مدة التعقيم لأكثر من ١٥ دقيقة وذلك حسب نوع وحجم وكمية المواد ويستخدم الأوتوكلاف لتعقيم البيئات الجرثومية والمحاليل التي لا تتأثر بالحرارة العالية وكذلك أطباق بتري الحاوية على مزارع جرثومية قديمة.

٣- التعقيم ببخار الماء المتقطع :

تدعى هذه بطريقة التندلة Tyndalysation نسبة للعالم تندال ، تفيد في القضاء على الجراثيم وأبواغها حيث تتلف اذا تكرر تسخينها عدة مرات وبفواصل زمنية كبيرة ، عند تعريض المواد المراد تعقيمها إلى بخار الماء بدرجة حرارة ١٠٠ مئوية فإن هذه الحرارة تقتل الجراثيم ولا تقتل الأبواغ ولكن عند ترك هذه المواد بدرجة حرارة الغرفة ٢٤ ساعة فإن هذه الأبواغ تنتش وعند تعرضها ثانية لبخار الماء بدرجة حرارة ١٠٠ مئوية فإنها تقتل الجراثيم المنتشة حديثا تكرر هذه العملية ٣ مرات حتى يتم القضاء على الجراثيم والأبواغ الموجودة .

مساوئ هذه الطريقة : إمكانية بقاء بعض الأبواغ دون انتاش والتي قد تنتش بعد انتهاء عملية التعقيم ، تستخدم هذه الطريقة لتعقيم البيئات الحاوية على سكريات وجلاتين وفيتامينات والتي يمكن أن تتحلل وتتفحم عند تعرضها لدرجات عالية من الحرارة والضغط .

يستخدم في هذه الطريقة جهاز الموصدة مع إبقاء صنبور بقاء الماء مفتوحا .

٤- التعقيم بالتسخين المتقطع :

تستخدم هذه الطريقة لتعقيم المواد التي تتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة

مثال مصل الدم يتخثر بدرجة حرارة (٦٥-٦٨) درجة مئوية لتعقيمه تغمر الزجاجات المحكمة الإغلاق الحاوية على المصل في الماء الساخن بدرجة حرارة ٥٦ م (مستوى الماء الساخن أعلى من مستوى الزجاجة) تعاد العملية على مدار ٧ أيام في كل مرة ساعة من الزمن .

ملاحظة : المواد الغذائية مثل اللبن والحليب تعقم بالبسترة (وهي التعرض للحرارة ٧٢ م مدة ١٥ ثانية) و إن عملية البسترة لا تهدف لقتل جميع المسببات المرضية الموجودة في الأكل

والشرب بل تقلل من عدد المسببات المرضية بحيث يصبح من غير المحتمل أن تسبب أمراضا (بشرط أن تحفظ المواد المبسترة بمكان بارد وتستهلك قبل انتهاء الصلاحية) و إن تعقيم الطعام والشراب بدرجات الحرارة غير شائع حيث أن ذلك يؤثر بشكل سلبي على طعم وجودة المنتج .

ثانيا – التعقيم بالطرق الآلية :

A- التعقيم بالترشيح :

تستخدم لتنقية السوائل من الجراثيم والتي لا يمكن تعريضها لدرجات عالية من الحرارة والتي يمكن أن تتغير مواصفاتها بتعرضها للحرارة مثل الأنزيمات واللقاحات والمضادات الحيوية مبدأه تمرير السوائل خلال مرشحات ذات مسام دقيقة تمنع نفوذ الجراثيم وهذه الطريقة لا تقتل الجراثيم وإنما تقوم بإزالتها فقط

C- التعقيم بالأشعة :

١- أشعة الشمس :

تأثير هذه الأشعة ضعيف غير أنه يمكن أن يقتل الجراثيم مثال عصيات السل الموجودة في طبقة رقيقة من القشع يمكن أن تقتل خلال ٨ ساعات عند تعرضها لأشعة الشمس .

٢- أشعة X او غاما :

تمنع هذه الأشعة اصطناع DNA الخلية الجرثومية وتوقف الانقسام الخلوي تستخدم لتعقيم المواد والأدوات الطبية التي تستخدم لمرة واحدة فقط كالمحاقن البلاستيكية والقفازات الجراحية بسبب نفوذيتها العالية

٣- التعقيم بالأشعة فوق البنفسجية :

هي أكثر الموجات إبادة للجراثيم لأنها تؤثر على المادة النووية للخلية الجرثومية وتؤدي إلى موت وتلف الجراثيم

تستخدم في تعقيم حجرات المخابر الجرثومية والفيروسية والهواء في غرف العمليات

عيبها الوحيد هو ضعف نفوذيتها وهذا ما يتطلب تعرض الجراثيم مباشرة لأشعتها فالجراثيم المغطاة بالورق او الزجاج او الأقمشة لا تتأثر بها .

ثانياً – التعقيم بالطرق الكيميائية :

كيفية عمل المعقمات والمطهرات المختلفة:

١- تدمير جدران الخلية وأغشيتها

٢- التداخل مع النشاطات الأنزيمية للميكروب

٣- تحطيم الخلية الميكروبية اما بـالأكسدة او الإختزال او التحلل المائي او التجلط او التأثير على البروتين او تكوين الأملاح.

كفاءة المعقمات والمطهرات على الميكروبات تعتمد على:

١- الوقت: المدة التى يتعرض فيها المادة للمعقم او المطهر

٢- درجة الحرارة

٣- التركيز وطريقة التحضير وتاريخه

٤- نوع الميكروب

٥- نوع المادة المراد تعقيمها

٦- مدى نظافة المادة المراد تعقيمها

٧- الطريقة المستخدمة

نهاية الجلسة

تصنيف المنابت الجرثومية وطرق تحضيرها

المنبت الجرثومي: مجموعة من المركبات الأساسية التي تؤمن للجراثيم المزروعة عليها كل من الغذاء ودرجة PH المناسبة له.

وتصنف الجراثيم بحسب نوعية المواد الغذائية التي تحتاجها إلى نوعين:

- الأول : تحتاج الجراثيم في نموها إلى مواد غذائية أساسية تحتوي على ذرات الكربون والأزوت ولبعض الجراثيم القدرة على الاستفادة من المواد العضوية كنزع ذرة الكربون الموجودة في أملاح السترات أو تستطيع تمثيل الأزوت الحر الموجود في الهواء لذلك سميت هذه الجراثيم بـ **(الجراثيم ذاتية التغذية)**
- الثاني : في حين أن بعض أنواع الجراثيم تحتاج إلى إمدادها بمواد غذائية جاهزة (أحماض أمينية – سكريات) مثل عصيات السل تحتاج لصفار البيض **(جراثيم غير ذاتية التغذية)**

تصنف المنابت بحسب بنيتها الفيزيائية إلى

منابت سائلة ومنابت صلبة ومنابت نصف صلبة

و إن المنبت المستعمل للحصول على عزولات نقية هي المنابت الصلبة لأن:

١- النمو على المنابت الصلبة يدل على ميزة واضحة من ميزات النمو التي تعطي تشخيص تأكيدي لنمو الجراثيم النامية فيه .

٢- النموات الحاصلة في المنابت السائلة عند الزرع الأولي للجراثيم هي نموات مختلطة وقد تحوي العديد من أنواع الجراثيم لذلك لا يمكن عزل الأنواع عن بعضها البعض.

تصنيف المنابت حسب الغرض من استعمالها :

أولاً- المنابت العادية : تنمو عليها معظم أنواع الجراثيم مثل

1- **ماء الببتون** : تركيبه (١٠غ ببتون + ٥غ كلور الصوديوم) في لتر ماء مقطر .

يحضر الببتون من ١كغ لحم بقري ناعم يغلى في ٢ لتر ماء لمدة ٢٠ دقيقة يترك ليبرد ثم تزال الطبقة الدهنية يرشح لتستخدم الرشاحة في لتر ماء مقطر

2- **المرق مغذي** : تركيبه ماء الببتون(١٠غ ماء ببتون + ٥غ كلور الصوديوم)+ ٥غ خلاصة اللحم

3- **الآجار المغذي** : (مرق مغذي + ١٥ غ آجار آجار)

ثانياً- المنابت الغنية :

وهي عبارة عن منابت عادية ولكن يضاف لها الدم أو المصل (الآجار المدمى) نزرع عليه جراثيم الباستوريلا أو يضاف المصل إلى منابت المايكوبلازما

ثالثاً- منابت انتقائية :

عبارة عن منابت تحوي مواد كيماوية تسمح بنمو بعض أنواع الجراثيم وتثبط نمو أنواع أخرى مثال١ إضافة سيلينات الصوديوم إلى المرق المغذي لتنمية عصيات السالمونيلا (مرق السيلينات)

مثال٢ آجار لوفن شتاين الذي يحوي صفار البيض المساعد على نمو عصيات السل وصبغة خضرة الملاشيت لتمنع نمو الجراثيم الأخرى .

رابعاً- المنابت التميزية :

وهي المنابت التي يضاف إليها مواد كيماوية لتميز مستعمرات الجراثيم بالاعتماد على الخواص البيوكيميائية للجراثيم مثل إضافة سكاكر الغلوكوز والسكروز واللاكتوز وكاشف أحمر الفينول وأحمر المتعادل للدلالة على تغير PH الوسط ومن هذه المنابت (ماكونكي ،EMB، كليجر) والتي يمكن أن تستخدم للتمييز بين جراثيم الإشريكية و السامونيلا .

النوع	الاستعمال	المثال
المنبت الاساس basal m.	منبت سائل يستعمل كأساس للمنابت الاخرى	ماء الببتون + الشوربة المغذية
المنبت الغني Enrichmed m.	يدعم نمو معظم انواع الجراثيم بما فيها تلك التي تتطلب احتياجات غذائية كثيرة	الآجار المدمى + آجار الشوكلاته + loffler's serum slope
النبت الانتقائي Selective m.	يعيق نمو الجراثيم الغير مرغوب في نموها على المنبت و يشجع تلك المرغوب في نموها	ماكونكي آجار + Bismuth sulphite Agar
منابت الاكثار enrichment m .	منابت سائلة تعمل على زيادة نمو الباكتيريا المرغوبة الى أعداد يمكن الكشف عنها و التعرف عليها	Tetrathionate broth + Selenite F + Alkaline peptone water
منابت تمييزية و ناقلة بنفس الوقت Selective and indicator transport m.	تؤمن الحفاظ على حيوية الجراثيم أثناء نقلها و كذلك فهي تملك مشعرات لونية و كواشف تميز نمو بعض أنواع الجراثيم من غيرها	ماكونكي آجار
المنابت التمييزية idicator m.	تميز مستعمرات جرثومية لنوع أو مجموعة ما من الجراثيم عن غيرها	ماكونكي آجار + stuart's m + Caryblair m
منابت الحفظ Storage m.	للحفاظ على العزولات الجرثومية في حالة حيوية جيدة	الآجار المغذي + Dorset egg m.

الأسس الغروية:
هي المواد الغروية التي يمكن أضافتها إلى المنابت السائلة لتحويلها إلى منابت صلبة وأكثرها استخداماً هو مادة (الآجار آجار)
الآجار آجار: وهو عبارة عن سكريات معقدة تستخلص من الأشنيات البحرية وهو قادر على تصليب ٦٠٠ ضعف وزنها ماء وينصهر بالدرجة (٩٥ – ١٠٠م) ويتصلب بالدرجة(٤٢ م) وهو خامل تجاه البكتريا أي ليس له تأثير معيق لنمو الجرثوم ولا يتأثر بالتحضين أي يحافظ على بنيته وخواصه ويبقى صلب
ملاحظة : المواد التي تتأثر بالحرارة يمكن أن تضاف للمنبت على الدرجة (٤٥-٥٠م) وقبل أن يتصلب الآجار مثل الدم او المصل او صفار البيض

تحضير المنابت وتعقيمها :
يتم تحضير المنابت بإضافة وزن محدد من مكونات المنبت الجاهزة للحل في كمية محددة من الماء المقطر حيث تسكب الكمية المراد حلها من هذه البودرة في الماء المقطر على علبة المنبت نفسه ويتم تحضير المنبت وفق الخطوات التالية :

١- توزن الكمية المحددة من بودرة المنبت .
٢- يحضر الحجم المطلوب من الماء المقطر في سلندر (بيشر).
٣- يصب قليلا من نفس الماء المحضر في الخطوة السابقة في حوجلة تحضير المنبت .
٤- تضاف البودرة إلى الحوجلة وتمزج جيداً .
٥- : يضاف باقي الماء ونتابع المزج .
٦- تغلق فوهة الحوجلة بغطاء خاص (مطاط) أو بورق الألمنيوم .

إذابة المنابت وتعقيمها :
توضع مادة الآجار آجار في المرق المغذي مثلاً أو في الماء المقطر ثم تترك لمدة ربع ساعة ليتشرب السائل ويسهل حل الآجار آجار ثم يسخن على البخار بالتحريك المستمر حتى تمام الذوبان لمدة ١ ساعة أو بالتسخين المباشر مع التحريك المستمر مع تجنب فوران المنبت .

تعقيم المنابت :
يتم التعقيم بالأوتوكلاف بالدرجة(١٢١ م) مدة ١٥ دقيقة ويمكن الإذابة والتعقيم معاً
أما بعض أنواع المنابت يشترط عدم استعمال التعقيم بالأوتوكلاف وإنما التسخين لدرجة الغليان التحريك والإغلاق الجيد لحويجلة المنبت لمنع التلوث ومن هذه المنابت (منبت السامونيلا و الشجيلا) .
كما أن بعض أنواع المنابت السائلة والمصول تعقم بالفلترة باستعمال مرشحات جرثومية لتجنب استعمال الحرارة في التعقيم .

إضافات المنابت :
بعض المواد التي يمكن إضافتها للمنابت والتي يمكن أن تتخرب بالدرجة العالية من الحرارة مثل (دم – مصل – صفار البيض) تضاف عندما تصبح درجة حرارة المنبت ٤٢ -٥٠ م .

صب المنابت :

المنابت السائلة القابلة للتعقيم يمكن صبها في أنابيب قبل إدخالها بالأوتوكلاف، أما المنابت الصلبة بعد التسخين والتعقيم تترك حتى تبرد لدرجة ٦٠ ° ثم تصب في أطباق بيتري شديدة التعقيم ثم تترك أغطية الأطباق غير محكمة الإغلاق بشكل مائل فترة من الزمن تحت الاشعة فوق البنفسجية بحيث يبرد المنبت ويتصلب ولايبقى بخار الماء عالقا بغطاء المنبت .

حفظ المنابت :

المنابت السائلة الموضوعة في أنابيب محكمة الإغلاق يمكن أن تحافظ على فعاليتها في البراد لمدة أسبوع ، بينما المنابت الصلبة توضع في البراد بشكل مقلوب بدرجة(٤-٥ م)في ظروف عقيمة وتبقى محافظة على فعاليتها مدة ٧- ١٠ أيام .

ملاحظة : يمكن حفظ المصل لفترة طويلة بدرجة حرارة (-١٠ حتى -٤٠) لتحت الصفر .

نهاية الجلسة

مبادئ و أسس الزرع الجرثومي

يعتمد الزرع الجرثومي الناجح على مجموعة أمور منها :

١. مدى الالتزام بقواعد جمع العينات ونقلها (مثلا للإقلال من التلوث ومنع الجراثيم المتعايشة من النمو..)
٢. اختيار المنبت المناسب كاختيار منبت ماكونكي لتنمية الجراثيم إيجابية غرام (ماكونكي منبت انتقائي لتنمية الجراثيم سلبية غرام)
٣. اختيار طريقة الزرع المثلى
٤. تأمين ظروف الحضانة المناسبة لنمو الجرثوم المشتبه به.

أولاً: قواعد جمع العينات ونقلها : تذكر في جلسة لاحقة .

ثانياً: اختيار المنبت المناسب : وهو ذلك المنبت الذي يشبه في تركيبه تركيب النسيج الحيواني الذي يتطفل فيه الجرثوم الممرض

/ مصدر كربوهيدراتي لتأمين الطاقة + مصدر آزوت عضوي + أملاح + دارئة PH و يضاف إليها أحياناً منشطات نمو تبعاً لنوع الجرثوم أو قواعد آزوتية أو مثبطات نمو للجراثيم المصاحبة .../

ويجب التنويه إلى أن هناك أنواع من الجراثيم لا تنمو على منابت الآجار المعروفة إنما تحتاج للزرع في **المزارع النسيجية** أو في كيس المح **لبيض** الدجاج المخصب المأخوذ من دجاج سليم (Specific Pathogen-Free (**SPF**) Eggs) و منها الريكتسيات و المتدثرة الببغائية (الكلاميدية بسيتاسي).

ثالثاً : زرع العينات على المنابت:

- يقصد بعبارة **الزرع الجرثومي** إدخال الجر ثوم الى المنبت و تنميته فيه .
- **أدوات زرع العينة** في المنبت : نذكر منها (اللوب العادي (ذي الرأس الحلقي) ، اللوب مقطوع الرأس ، المفرش ذي الزاوية القائمة ، المفرش ذي الرأس المثلثي ، ملاقط ، ماصات باستور ، محاقن ، المسحات وهناك أجهزة الزرع الأوتوماتيكي)

- **اللوازم المخبرية المساعدة** : أحواض التعقيم مع سوائل التعقيم ، مقصات ، مشرط ، **مصدر لهب** ، غرفة زرع زجاجية قابلة للتعقيم بالأشعة ، حامل للوب ، بيشر ، لاصق خاص لإحكام إغلاق المنبت ، شمع ...

- **طرق الزرع الجرثومي على المنابت:**

تختلف طريقة الزرع بحسب نوع المنبت المراد الزرع عليه ونوع العينة

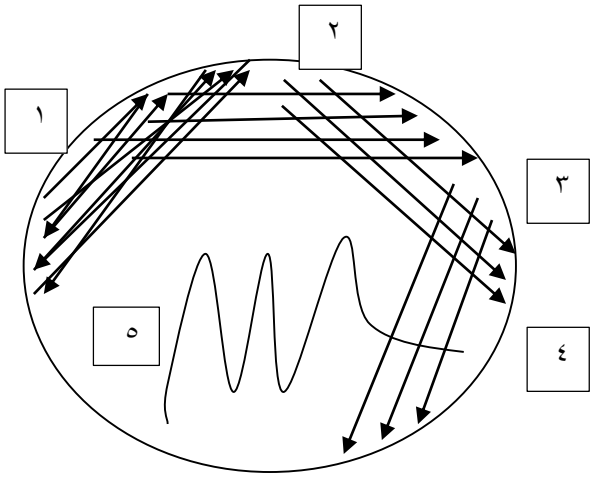
a) الزرع على **المنابت الصلبة الغنية** بهدف **العزل و التنقية** (من عينة سائلة ، من عينة أمعاء ، من الكبد و الرئة ، من مستعمرة موجودة على منبت سابق)
b) الزرع على **المنابت الصلبة التمييزية**
c) الزرع على المنابت الصلبة بهدف اجراء **اختبار الحساسية** للصادات الحيوية
d) الزرع على المنابت الصلبة بهدف **حساب الحمولة الجرثومية** في العينة المزروعة (بالحقن ، بالفرش ، بالفلترة)
e) الزرع على **المنابت الصلبة المائلة** (اختبارات بيوكيميائية ، زرع نظير السل ....)
f) الزرع في **المنابت السائلة** / الإكثار(هوائي ، لأهوائي) ،اختبار العقامة ، الاختبارات البيوكيميائية(إنتاج الغاز، الأكسدة والتخمير ، الاندول ....) / .
g) الزرع **بالغرز** في **المنابت نصف الصلبة** (اختبار الحركة ، منبت فليتشر لزرع البريميات..)

١- الزرع على **المنابت الصلبة الغنية** بهدف **العزل الاولي** :

نستعمل اللوب ذي الرأس الحلقي حيث نأخذ لوب أو لوبين من العينة ثم نفرشها في المنبت وفق الرسم التالي :

يمكن استخدام الماسحة بدلا من اللوب في الخطوة الأولى من زرع بعض أنواع العينات(الخطوة رقم١ على الرسم)

وعموماً فلابد من تمرير اللوب على اللهب ثم تبريده قبل أخذ العينة ثم نكرر العملية بين كل مرحلتين متتاليتين من مراحل الزرع الموضحة في الرسم أعلاه ، ولا بد من اجراء كل مراحل الزرع **قرب اللهب** لضمان عدم تلوث المنبت.



٢- الزرع على المنابت الصلبة التمييزية:

نأخذ بواسطة اللوب الملهب و المبرد جزء بسيط من **مستعمرة منفردة** موجودة على المنبت **الغني** ثم نمسحها على المنبت التمييزي بنفس طريقة الرسم السابق.

٣- الزرع على المنابت الصلبة المائلة:

نستخدم اللوب ذي الرأس الحلقي للزرع فبعد تعقيمه و تبريده نأخذ بواسطته من مستعمرة منفردة نامية على سطح المنبت الغني ثم نفتح الأنبوب الحاوي على المنبت المائل بجانب اللهب بشكل يضمن عدم التلوث ثم ندخل اللوب إلى الأنبوب و نبدأ بملامسته للسطح المائل للمنبت من أبعد نقطة و باتجاه الخارج مع الحركة الزكزاكية ثم نغلق الأنبوب و نضعه على حامله في الحضانة الجرثومية .

٤- الزرع في المنابت السائلة :

نستخدم ماصة باستور المعقمة أو اللوب ذي الرأس الحلقي أو الماسحة أو سيرنغ معقم أو ملقط معقم مع مقص معقم حسب نوع العينة (صلبة أو سائلة) و المهم توخي الحذر لتجنب تلوث المنبت ثم لابد من تامين الوسط اللاهوائي المناسب عند الضرورة بالطرق

المختلفة (صب الزيت على السطح بعد الزرع ، طريقة التسخين ثم التبريد السريع قبل عملية حقن العينة ، إضافة المواد المرجعة الغير سامة إلى المنبت السائل ، ...)

٥- الزرع بالغرز في المنابت نصف الصلبة:

و نستخدم لهذا الغرض اللوب مقطوع الرأس (مثل الإبرة) ،نأخذ برأس اللوب الملهب و المبرد جزء من مستعمرة الجرثوم المراد دراسة خواصه الحركية ثم نطعن المنبت النصف صلب في وسطه باتجاه الأسفل حتى يصل رأس الإبرة إلى قرب العقر السفلي للمنبت ثم نسحب الإبرة باتجاه الأعلى و نحررها من المنبت و بذلك ننهي عملية الزرع .

رابعاً: تأمين ظروف الحضانة المناسبة لنمو الجرثوم :

١. الظروف الهوائية المناسبة :

تقسم الجراثيم حسب احتياجاتها الهوائية الى :

الجراثيم الهوائية المجبرة [Strict or Obligate] Aerobes :

تحتاج تراكيز من الاوكسيجين أكبر أو يساوي تركيزه في الهواء

الجراثيم اللاهوائية المخيرة Facultative Anaerobes:

تستطيع النمو جيدا في غياب الاوكسيجين أو (بوجوده بنسب مكافئة لمحتوى الهواء منه)

الجراثيم دقية الهواء microphilic Aerobes : تعتمد على الأكسيجين في استقلابها ولكنها لاتستطيع النمو بوجود نفس نسب الاوكسيجين الجوي انما تحتاج لمستويات منخفضة من الأوكسيجين(معظم أنواع المقوسات، بوريليا، سيربولينا،...)

الجراثيم اللاهوائية المجبرة(strict or obligate Anaerobes) : لا تستطيع النمو بوجود الاوكسيجين بتراكيز مماثلة لتركيزه الجوي وهي لا تعتمد على الأوكسيجين في استقلابها و يجب تأمين ظروف لاهوائية لنموها ومن أهم أمثلتها :

/ الفطور الشعية البقرية ، المغزليات، المقوسة ميكوزاليس، المطثيات و غيرها /

الجراثيم المحبة لثاني أوكسيد الكربون : Capnophilic bacteria

وهي تحتاج لوجود ثاني أوكسيد الكربون بنسبة ٥-١٠ % في وسط التحضين و من أمثلتها (البروسيلا ، الفطور الشعية ، الليستريا ،...)

و تؤمن الظروف اللاهوائية باحدى الطرق المختلفة التالية :

- جرة اللاهوائيات الحاوية على مغلفات من مواد كيماوية ماصة للأوكسيجين و مولدة في نفس الوقت لثاني أوكسيد الكربون:

بعد وضع المنابت بشكل مقلوب في الجرة يفتح الظرف (بعض الانواع تحتاج اضافة القليل من الماء لمحتوى الظرف) ثم يوضع في الجرة وبعد ذلك يُحكم اغلاق الجرة ثم تُوضع في الحاضنة الجرثومية

- يمكن اشعال الشمعة أو قطعة من القطن ووضعها فوراً في جرة اللاهوائيات الحاوية على المنابت المزروعة بشرط احكام اغلاق الجرة مباشرة و نستدل في هذه الطريقة على تأمين الظروف اللاهوائية بانطفاء الشمعة .
- جرة اللاهوائيات ذات الصمامين و الحاوية على **حبيبات البلاديوم** ، ونحتاج في هذه الطريقة **لأسطوانه الغاز البديل** (تملأ عادة بمزيج غازي يحوي/ الهيدروجين و النتروجين وثاني أوكسيد الكربون/ و توصل الى الصمام الاول)

ومضخة تفريغ خاصة توصل الى صمام التفريغ للجرة كما نحتاج **لمشعر لوني** للدلالة على فقدان الاوكسيجين وتجري عملية تفريغ الهواء بعد غلق الجرة ثم يضخ الغاز البديل في الجرة ثم تسخن حبيبات البلاديوم التي تحفز تفاعل الاوكسيجين الباقي في الجرة مع الهيدروجين لانتاج قطيرات من الماء و عند غياب الأوكسيجين يتغير لون المشعر ليدل على تحقق الظرف اللاهوائي المناسب

- أنبوب بوخنر ونحتاج عند استعماله للزرع اللاهوائي الى مسحوق **البيروغالول** و محلول **ماءات الصوديوم** اللذان يمزجا في قعر أنبوب بوخنر للتخلص من الأوكسيجين الموجود في الحيز العلوي المغلق من أنبوب بوخنر.
- طريقة قسم المنبت الصلب الى قسمين و زرع جراثيم هوائية مجبرة في أحد القسمين ثم احكام اغلاق المنبت بالشمع
- طريقة الزرع في المنابت السائلة المضاف اليها نسبة بسيطة من الآجار و المسخنة للتخلص من أوكسيجنها ثم المبردة سريعا الى الدرجة ٥٠ مئوية تقريباً .
- يمكن تقليل نسب الاوكسيجين في المنابت باضافة المواد المرجعة الغير مؤثرة سلبا على نمو الجراثيم مثل **الغلوكوز** أو **ثيوغليكولات الصوديوم** أو **سلفيد الصوديوم** أو **النسج الطازجة** المأخوذة من حيوانات **سليمة** مذبوحة حديثا / كبد، طحال ، كلية وهذه النسج تحتاج معاملة خاصة قبل استعمالها لضمان العقامة /

- **الحرارة المناسبة :** تعتمد درجة حرارة التحضين على نوع الجرثوم الهدف الذي نتحرى عنه فلكل نوع جرثومي **مجال حراري** يزدهر فيه و ينمو بشكل جيد و لكن على العموم فان معظم الجراثيم **الممرضة للحيوانات ذوات الدم الحار و للانسان** تنمو بشكل جيد على درجة حرارة ٣٧ مئوية و لكن قد نحتاج لزرعها في المجالات الحرارية المثلى لها و ذلك للسماح بعزلها عن غيرها من الجراثيم المصاحبة بشكل أفضل فمثلاً عند عزل جراثيم **الليستريا** أو **اليرسينيا** فاننا نزرع العينات المشتبهة أولا في منابت الاكثار الملائمة و نبقيها في **البراد** لفترة من الزمن للسماح باكثار هذين النوعين من الجراثيم و تثبيط نمو الجراثيم المصاحبة في حين أن **المطثية الحاطمة** تنمو في مجال حراري (٣٧ – ٤٥) درجة مئوية

ونذكر أيضا **البريميات(الليبتوسبيرا)** التي تنمو في مجال حراري ٢٨- ٣٠ مئوية و **المقوسة الصائمية** التي تنمو عند الدرجة ٤٢ مئوية ....

٢. **الرطوبة المناسبة** : يجب تأمين الرطوبة المناسبة في الحضانة بحيث نضمن عدم جفاف المنبت أثناء فترة التحضين ولا ننسى أن أكثر من ٨٠% من وزن الخلية الجرثومية هو ماء .

٣. **زمن التحضين المناسب :**

٣-١٦ أسبوع	٢-٣ أسبوع	٤- ٦ يوم	٤٨- ٧٢ ساعة	٢٤-٤٨ ساعة
المتفطرات	الفطور الجلدية	البروسيلا	الجراثيم سريعة النمو عندما تزرع على منابت انتقائية	معظم الجراثيم سريعة النمو
بعض أنواع البريميات		المقوسات		
		المايكوبلازما		
		النوكارديا استرويدس		

ولا بد من التنويه أن **زمن التحضين في المنابت السائلة** يكون عادة **أقل** منه في المنابت الصلبة لنفس النوع الجرثومي

نـهاية الجلسة

الفحص المجهري للجراثيم الملونة

- **يهدف تلوين الجراثيم إلى :**

١- إظهار شكل الجرثوم ودراسة صفاته الشكلية (مكورات – عصيات – وجود المحفظة أو الأهداب أو الأبواغ ٠٠٠٠الخ)

٢- يفيد تلوين الجراثيم بقتلها وحماية الفاحص من العدوى لذلك تثبت اللطخات الجرثومية الملونة على شرائح زجاجية عقيمة وتفحص مجهرياً

- **تثبيت اللطاخة الجرثومية للتلوين :**

نستخدم عروة الزرع المعقمة لهذا الغرض وتؤخذ بها العينة من المرق المزروع أو من المستعمرات وتفرش على الصفيحة الزجاجية المعقمة في ماء مقطر بحركات دائرية قطرها ٢-٢,٥ سم لتتشكل رقاقة على سطح الشريحة ثم تترك الصفيحة الزجاجية على الحامل في حوض الغسيل حتى الجفاف التام بالهواء ثم تمرر على اللهب بدرجة حرارة من ٤٥ - ٥٠ مئوية بسرعة معتدلة ثلاث مرات وبذلك يتم تثبيت وقتل الجرثوم على الصفيحة الزجاجية وهذا ما يسمى بعملية تثبيت الجرثوم إذ يتم تخثر المواد البروتينية والمخاطية في الخلية الجرثومية

- الملونات الجرثومية :

تلون الجراثيم بملونات خاصة وهذه الملونات إما أن تترسب على الجراثيم أو تدخل الخلية الجرثومية عبر جدارها وتكون معقدات كيماوية مع محتوى الخلية الجرثومية

وعلى هذا يمكن تقسيم الملونات إلى

١- **ملونات قاعدية :** تلون الأحماض النووية في النواة الجرثومية مثل (أزرق الميتيلين – بنفسجية الكريستال) .

٢- **ملونات حامضية :** تلون الهيولى الجرثومية مثل (الأيوزين) .

- **طرق تلوين الجراثيم الجرثومي**

١- الصباغة السلبية :

تلون بهذه الطريقة المساحة المحيطة بالجرثوم دون أن يتلون الجرثوم الذي يظهر كجسم شفاف واضح ضمن المساحة (مثل استخدام الحبر الصيني لتلوين المكورات الخفية)

٢- الصباغة البسيطة :

يستخدم في هذه الطريقة ملون واحد فقط كما هو الحل عند تلوين الفطور الجلدية بماءات البوتاسيوم

٣- الصباغة النوعية :

وفيها تستخدم صبغات خاصة لتلوين أجزاء من الجرثوم (المحفظة ، الجدار ، الأهداب ، السياط ، الأبواغ...) مثل استخدام صبغة راكت لتلوين الأبواغ .

٤- الصباغة التميزية :

توجد طرق عديدة للصباغة التمييزية وذلك لتمييز أنواع الجراثيم عن بعضها البعض أهم هذه الطرق: طريقة غرام ، طريقة زيل نيلسون(لتلوين عصيات السل) ، صبغة جيمسا، صبغة رايت.

طريقة غرام :

تعد هذه الطريقة من أكثر الطرق استخداماً في تلوين الجراثيم إذ قسم فيها العالم الدانماركي هانس كريستيان غرام الجراثيم بناءً على تركيب الجدار الجرثومي إلى مجموعتين

المجموعة الأولى: تتلون بلون أزرق أو بنفسجي وتعد إيجابية الغرام (بنفسجية الكريستال)

المجموعة الثانية: تتلون بلون أحمر وتعد سلبية الغرام (السفرانيين)

المحاليل اللازمة لطريقة غرام

١- محلول بنفسجية الكريستال

٢- محلول الأيودين /لتثبيت بنفسجية الكريستال/

٣- كحول إيتيلي ٩٥% (مزيل للون بنفسجية الكريستال)

٤- محلول السفرانيين أو الفوكسين الكربولي

طريقة التلوين بصبغة غرام

توضع قطرة من الماء المقطر على الصفيحة الزجاجية المعقمة ثم توضع في عروة الزرع مسحة من المستعمرات الجرثومية في هذه القطرة وتفرش بالتحريك المستمر البطيء ليتشكل لدينا رقاقة مفروشة على الصفيحة نتركها تجف في الهواء بالقرب من مصدر حراري

تثبت اللطاخة الجرثومية بإمرارها على اللهب عدة مرات بسرعة معتدلة وبدرجة حرارة ٤٠ - ٥٠ م

١- تغمر الشريحة بمحلول بنفسجية الكريستال لمدة دقيقة واحدة .

٢- تغسل الشريحة الزجاجية بالماء المقطر وتغمر بمحلول الأيودين لمدة ١ دقيقة ثم تغسل الشريحة من الأيودين بالماء المقطر.

٣- تغمر الشريحة بالكحول الإيتيلي ٩٥% كونه مزيل للون لمدة ٢٠-٣٠ ثانية .

٤- تغسل الشريحة بمحلول السفرانيين مدة ٣٠-٦٠ ثانية أو بالفوكسين الكربولي مدة٣٠ثانية .

٥- تغسل الشريحة بالماء المقطر ثم تجفف وتفحص تحت المجهر بالعدسة الزيتية فتتلون الجراثيم بلون بنفسجي أو أزرق إذا كانت إيجابية لصبغة غرام أو تتلون بلون أحمر زهري إذا كانت سلبية لصبغة غرام .

النتيجة: تتلون الجراثيم إيجابية الغرام بلون بنفسجي مثل جراثيم المطثيات والمكورات العنقودية في حين تتلون الجراثيم سلبية الغرام بلون أحمر مثل جراثيم السالمونيلا و E.coli.

نهاية الجلسة

اختبار الحساسية

الصادات الحيوية :

هي مواد تفرزها بعض أنواع البكتريا والفطريات أو قد تصنع مخبرياً ذات تأثير نوعي على الجراثيم وذلك بتراكيز منخفضة وتختلف هذه الصادات بفعاليتها أو تأثيرها على الجراثيم فإما أن تكون محدودة الطيف أو واسعة الطيف مثل (البنسلين- الكولستين) تأثيرها هام في ردود فعل الجراثيم سلبية الغرام أما (التتراسكلينات- السلفاميدات) لها تأثير واسع الطيف على الجراثيم إيجابية وسلبية الغرام وكذلك الجراثيم الهوائية واللاهوائية

تاريخ اكتشاف الصادات الحيوية :

ويذكر التاريخ للقدماء المصريين، أنهم أول من اكتشف استخدام العفن في علاج الجروح، إذ كانوا يضعون مسحوق العفن الموجود على الخبز، أو قماشاً مبللاً بماء البرك الراكد الآسن، على الجروح فتشفى. وفي منتصف القرن التاسع عشر، لاحظ العالم الفرنسي لويس باستير (Louis Pasteur)، أن جرثوم الجمرة الخبيثة، القاتل للإنسان والحيوان، لا يستطيع النمو في المخبر ، إذا تلوثت الآنية، التي تحتويه بالعفن الموجود في الجو، والتربة الزراعية .وتوصل إلى النتيجة عينها في الوقت نفسه، العالم الإنجليزي ويليام روبرتس (William Roberts) ، الذي كتب مندهشاً في عام ١٨٧٤، أن أنواعاً كثيرة من البكتيريا، لا تنمو في وجود فطر البنسيليوم (Penicillium glaucum). وظل هذا الاكتشاف حبيس الكتب القديمة، حتى عام ١٩٢٨؛ حين لاحظ العالم الإنجليزي سير الكسندر فلمنج (Alexander Fleming) ، أن أحد الفطريات من نوع البنيسيليوم (Penicillium notatum) يفرز مادة، أطلق عليها "بنسيلين"، قادرة على قتل البكتيريا الموجودة حولها.

الهدف من إجراء ختبارات التحسس :

هو تمكين الطبيب من اختيار أفضل الصادات الحيوية المؤثرة على نوع معين من الجراثيم كما يعطي نتائج حقلية أفضل وخاصة عند اكتساب بعض أنواع الجراثيم المقاومة لاتجاه بعض المضادات الحيوية

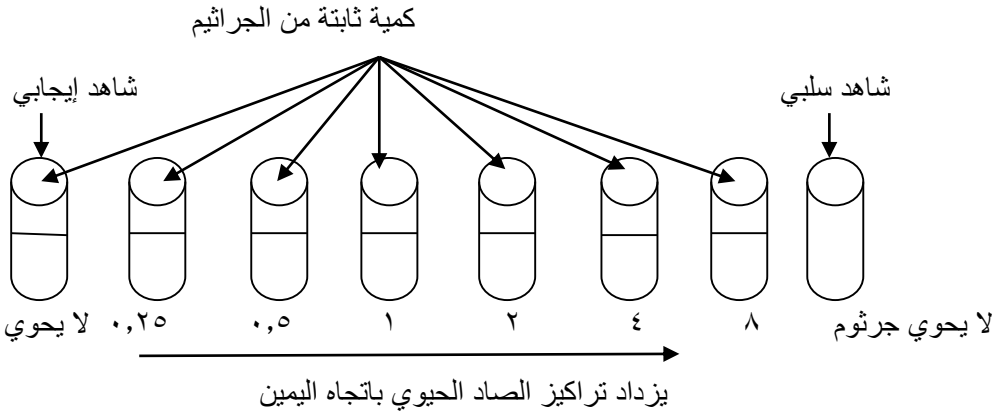
طرق اختبار الحساسية

١- طريقة التمديد :

نجري هذه الطريقة في وسط سائل في أنابيب تؤخذ تراكيز متزايدة من الصادات الحيوية في الأنابيب ويضاف لها كمية ثابتة من المعلق الجرثومي المراد اختباره ويخصص أنبوبين أحدهما شاهد إيجابي لا يحوي صاد حيوي والثاني شاهد سلبي لا يحوي الجرثوم وبعد التحضين لمدة ٢٤ ساعة بدرجة ٣٧ ° تتم مقارنة نمو الجراثيم في الأوساط الحاوية على الصاد الحيوي ثم يعين أصغر مقدار من الصاد الحيوي المانع لنمو الجرثوم ويستخدم هذا الاختبار في :

a- تحديد الجرعة المناسبة من الصاد الحيوي لكل حيوان

b- يستخدم لتحديد أقراص الحساسية من الصاد الحيوي



٢- طريقة الانتشار:

هي الطريقة الأكثر استخداماً في المخابر يستخدم فيها أوراق النشاف المشبع بتركيز معين لكل نوع من أنواع الصادات الحيوية توضع الأقراص على المنبت بعد وضع العينة المراد اختبارها فتؤدي رطوبة المنبت إلى انتشار متتابع للصاد الحيوي مترافق مع انخفاض تركيز الصاد الحيوي وبعد تحضين ٢٤ ساعة وبدرجة ٣٧م **تقرأ النتائج**

a- لا يوجد منع نمو جرثومي فتصل الجراثيم إلى القرص وتعتبر غير حساسة للصاد الحيوي

b- يوجد هالة محيطة خالية من أي نمو جرثومي تشكل دائرة حول القرص وبالتالي تعتبر الجراثيم حساسة

خطوات العمل

١- تؤخذ العينة من الطيور المصابة قبل إجراء أي معالجة بالصاد الحيوي ثم تزرع على منابت غنية ليتم التحضين

٢- بعد التحضين تؤخذ ثلاث مستعمرات من نوع واحد وتمزج في ٤ مل من منبت تريبتوكاز الصويا السائل ويحضن الأنبوب السائل بدرجة ٣٧° لمدة ١٨-٢٤ ساعة حيث يؤدي ذلك لتعكر الوسط السائل .

٣- يؤخذ بواسطة ماسحة عينة من الأنبوب وتمسح على كامل المنبت المصبوب في أطباق بيتري بشكل منتظم ثم يترك المنبت بشكل مقلوب حتى يجف

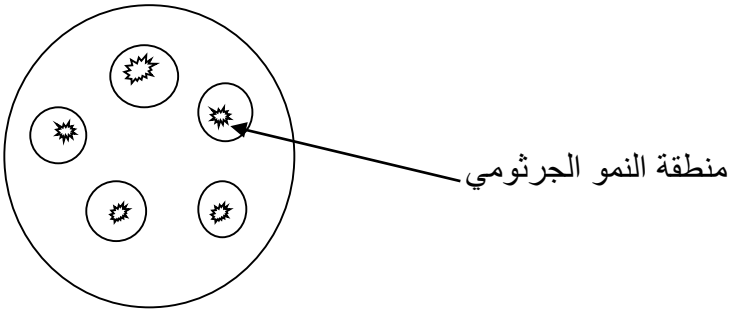
٤- تؤخذ أقراص الحساسية بواسطة آلة خاصة أو ملقط معقم وتوزع بانتظام على سطح المنبت بحيث يترك بينها مسافات متساوية حوالي ٢,٥ سم

٥- يحضن المنبت الصلب في الحضانة مدة ١٨-٢٤ ساعة بدرجة ٣٧° ثم تقاس أقطار منع النمو الجرثومي حيث أن قطر منع النمو الجرثومي يتوقف على حساسية الجراثيم للصاد الحيوي

تأزر الصادات الحيوية : نعني بذلك استخدام أكثر من صاد حيوي في معالجة الحالة المرضية حيث يؤدي ذلك لنتائج أفضل من استخدام كل صاد حيوي على حدى ، تتم الدراسة في اختبار الحساسية على المنبت الصلب كما يلي :

عند وجود تأزر بين مضادين حيويين إذا كانا متجاورين على المنبت يجب أن يحدث تلاقي بين الدائرتين بشكل اهليلجي وعدم التلاقي بين الدوائر لا يعني دائما عدم وجود تآزر وربما يكون ذلك بسبب أقراص الحساسية عن بعضها البعض .

عينة من الطيور ←منبت غني ←منبت تريبتوكاز الصويا←منبت الحساسية



نهاية الجلسة العملية

مبادئ وأسس تشخيص الأمراض الفيروسية

يعتمد التشخيص المخبري لأي مرض على إظهار العامل المسبب لهذا المرض ويمكن الوصول إلى ذلك بتطبيق واحد أو أكثر من **تقنيات التشخيص المخبري** التالية:

١- الفحص المجهري المباشر للعينة : إما محضرات طازجة مصبوغة أو غير مصبوغة

٢- الزرع الجرثومي للعينات على المنابت الجرثومية ودراسة الخواص الشكلية والكيمياحيوية للعامل المسبب

٣- اختبار التحسس للصادات الحيوية

٤- الاختبارات المصلية : على مصل دم الطائر باستخدام أحد التقنيات التالية (التألق المناعي – المقايسة المناعية بالأنزيم المرتبط E lisa – اختبار التعادل – اختبار التعادل – اختبارات التراص الدموي)

٥- تقنيات حديثة متعلقة بالأحماض النووية للمسبب وتعتمد على الكشف عن مورث محدد خاص بالنوع الجرثومي مثل تقنية تفاعل البوليميراز PCR.

أخذ العينات للفحوص الجرثومية

شروط أخذ العينة

١- أن تتمثل العملية المرضية في العينة

٢- تجنب تلوث العينة من سطح الطائر أو من الوسط المحيط

٣- أن تكون كمية العينة كافية لإجراء كل الاختبارات

٤- أخذ العينة قبل معالجة القطيع بالمضادات الحيوية

٥- نقل العينة مباشرة إلى المخبر لفحصها أو تبرد العينة بشكل مناسب لمنع الجراثيم المصاحبة من النمو

٦- تحتاج الجراثيم إلى منابت نقل مناسبة لذا يجب أخذ ذلك بعين الاعتبار عند الشك بها

العينات المطلوبة للفحص الجرثومي

يحدد نوع العينة عادةً حسب نوع المرض أو حسب نوع المسبب المراد الكشف عنه

١- عينات من الأعضاء التي تتغذى على كمية كبيرة من الدم مثل الكبد والطحال والقلب والكلية

ملاحظة : تؤخذ العينات من هذه الأعضاء بعد النفوق مباشرةً وقبل فتح القناة الهضمية

٢- عينات الدم : إما للكشف عن وجود الجرثوم في الدم في حال وجود تجرثم دموي أو للكشف عن الأجسام المضادة الموجودة بالدم

٣- السائل الزليلي للمفاصل ولكن هذه العينات تراعى شروط التعقيم وبدقة

٤- عينات الأمعاء قسم منها يحفظ بالتبريد والقسم الأخر يحفظ بالفورمالين

٥- عينات الدماغ : قسم منها يحفظ بالتبريد وقسم يحفظ بالفورمالين

٦- مسحات مزرقية وذلك باستخدام مسحة قطنية معقمة تستخدم مباشرةً أو تحفظ بالتبريد

الملاحظات أو المعايير التي يجب أن يلتزم بها عند جمع العينات

١- تؤخذ العينات من الطيور النافقة حديثاً

٢- تؤخذ العينات من الطيور التي تظهر عليها الأعراض ومن الأعضاء التي تظهر عليها الصفات التشريحية

٣- تؤخذ العينة بحيث تضم المنطقة المصابة وقليلاً من النسيج السليم

٤- نراعي عدم تلوين العينة ما أمكن ولا بد من أخذ العينة قبل استعمال أي نوع من أنواع العلاج

ملاحظة : يجب حماية المسحات من التجفاف بوصفها بيئات خاصة مناسبة لنمو العينات

٥- توضع العينات في عبوات معقمة وتسد بأحكام ويسجل عليها تاريخ جمع العينات وأسم صاحب القطيع

ملاحظة : في حال تأخر نقل العينة إلى المخبر فيجب وضع العينات بدرجة حرارة ٤ م لحين العمل بها (يتم الحفظ بالتبريد العادي وليس بالتجميد)

نهاية الجلسة

الاختبارات المصلية
Serological tests

- تستخدم الاختبارات المصلية في التشخيص المخبري للأمراض وهي تعتمد على ***مبدأ تفاعل الضد مع المستضد النوعي*** وتظهر النتيجة على شكل { ترسبات – تراص – تعديل ... }

وللاختبارات المصلية نوعان :

- يمكن الكشف عن **المستضد المجهول** بواسطة الاختبارات المصلية ***باستخدام أضداد نوعية*** معروفة مسبقاً **(الاختبارغير المباشر)**
- أو البرهان على ***الأضداد المتشكلة في الدم*** بسبب الإصابة بمرض أو التحصين باستخدام ***مستضدات معروفة مسبقاً*** . **(الاختبار المباشر)** يستخدم /لإثبات وجود المرض + معايرة الأضداد/

المواد المستخدمة في الاختبارات المصلية:

- **مستضدات**:Antigens(مولدات الضد) يرمز لها بالرمز **Ag** مثل:

  جراثيم أوالفيروسات .....

  البروتينات الغريبة : (سموم)

- **الأضداد :** (الأجسام المضادة)- (الغلوبلينات المناعية) **Ab** Antibody

  مواد بروتينية ينتجها الجهاز الشبكي البطاني (الجهاز المناعي) والتي ترتبط مع المستضد الذي أدى لتشكيلها ← (ترسيب – تراص – حل)

- **المصل الضدي النوعي :**

  مصل حاوي على ***أجسام مضادة*** لنوع معين من المسببات المرضية

- **المتممة:** شكل من اشكال الأضداد وهو عبارة مركب طبيعته بروتينية له دور في التفاعلات المناعية يتلف على ٥٦ مْ ٣٠ د

- **ضد الضد:** يحضر بأخذ نوع معين من الأضداد و تحقن في حيوان من نوع آخر فيشكل لها هذا الحيوان أضداد تسمى ضد الضد .

- **ضد الضد موسوم :** وهي عبارة عن أضداد تكون موسوم بمادة تتألق عند تعرضها للأشعة .

١- اختبار الترسيب في الآجار الهلامي (الانتشار المناعي) :

المبدأ : ترسيب ***المستضدات الذوابة*** عند تفاعلها مع **الأضداد** النوعية لها **(المرسبات)**
← ***تكوين رواسب غير ذوابة أو خطوط ترسيب في الأغار الهلامي***

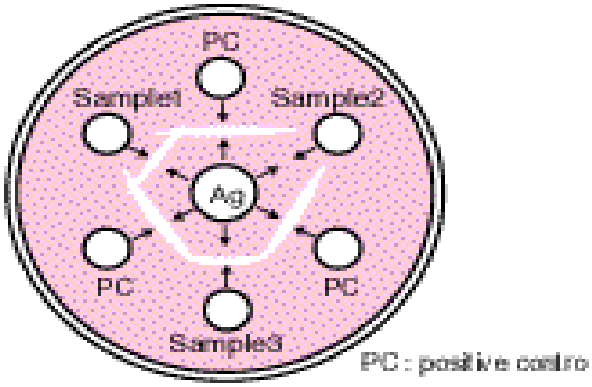
يستخدم اختبار الترسيب في الآغار الهلامي (الانتشار المناعي) للبرهان على بعض الأمراض (مرض الارتعاش الوبائي)

ولهذا الاختبار نوعان :

A- ***اختبار الانتشار المناعي الثنائي (اخترلوني)***

المبدأ : انتشار الضد والمستضد الموجودين في حفرتين متقابلتين ضمن بيئة الآغار الهلامي وتكوين مركب (ضد – مستضد) يظهر بشكل خط ترسيب أبيض يرى بالعين المجردة .

طريقة العمل : يصب الآغار الهلامي في طبق بتري أو شريحة ثم يتم تفريغ ٦ ثقوب محيطية وواحد مركزي



يتم التحضين في وعاء رطب بدرجة حرارة الغرفة (٢٤ – ٧٢) ساعة

النتيجة : ← وجود خطوط ترسيب ⟸ نتيجة ايجابية

عدم وجود خطوط ترسيب ⟸ نتيجة سلبية

B- ***اختبار الانتشار المناعي الأحادي (مانسيني)***

يمزج الضد مع الآغار الهلامي ، ثم يصب في طبق بتري ، ثم يعمل ***فجوات وتملأ هذه الحفر بالمستضد بتمديدات مختلفة*** .

في الحالة الإيجابية : تتشكل حلقة ترسيب حول الحفرة التي فيها ***منطقة التكافؤ*** بين الضد والمستضد ، حيث قطر هذه الحلقة يشير إلى كمية المستضد المنتشرة يمكن إجراء الاختبار بطريقة عكسية [مزج المستضدات مع الآجار]

٢ -*اختبار التراص* :

- ***المبدأ :*** تجمع والتصاق المستضدات ذات البنية الجسيمية كالجراثيم مثلاً عند تفاعلها مع الأضداد النوعية لها **(الراصات)** ويمكن رؤية النتيجة بالعين المجردة

وله نوعان

اختبار التراص **على الشريحة** (تقصي عن جرثوم أو فيروس....)

اختبار التراص **في الأنابيب** (معايرة الأضداد) وتأكيد وجود المرض

تطبيقات عملية **للاختبار**

١) اختبار التراص على صفيحة للتقصي على المفطورة جاليسيبتكوم والمفطورة الزليلية
٢) اختبار التراص السريع للتقصي عن السلمونيلة بللوروم عند الدجاج (تراص على الصفيحة)

A- اختبار التراص السريع على الشريحة للكشف عن السالمونيلا بللوروم
المستضد : جاهز (معلوم) هو جرثومة السالمونيلا .

يجرى الاختبار بطريقتين :

آ) تراص باستخدام الدم الكامل :

قطرة مستضد + قطرة عينة دم كامل ، ثم مزج بقضيب زجاجي ، ثم تحريك بلطف

تقرأ النتيجة خلال ١ دقيقة .

ب) التراص باستخدام مصل الدم :

قطرة مستضد + قطرة مصل دم (15 µl)

تقرأ النتيجة خلال ١ دقيقة .

ملاحظات تتعلق بالاختبار للتقصي على السالمونيلا :

١- يجرى الاختبار بدرجة حرارة الغرفة ٢٠ – ٢٥ مْ بعيدة عن الضوء والشمس

٢- دم غير متخثر

ولكن إذا كانت النتيجة إيجابية فيجب تأكيد النتيجة الإيجابية باختبارات مصلية أخرى (التراص بالأنابيب أو الإليزا .....)

٣- اختبار التألق المناعي :

- ***مبدأ الاختبار :*** إظهار ارتباط الضد مع المستضد في محضر مجهري (***مقاطع أعضاء – مزارع خلوية***)

من خلال اتحاد الضد مع مادة متألقة (فلوريسين إيزوثيوسيانات) مما يؤدي إلى ظهور لون أخضر لامع للمركب { ***مستضد + ضد موسوم*** } وذلك تحت المجهر التألقي .

- يفيد الاختبار في الكشف على
  - المستضدات (التألق المناعي المباشر)
  - الأضداد : (التألق المناعي غير المباشر)

تطبيقات التألق المناعي

- ١- اختبار التألق المناعي ***المباشر*** للبرهان على الإصابة بالمتدثرات ***الكشف عن الأضداد***

- ٢- اختبار التألق المناعي **غير المباشر** للبرهان على الإصابة بالمتدثرات ***الكشف عن المستضدات***

١- اختبار التألق المناعي المباشر للبرهان على الإصابة بالمتدثرات

طريقة العمل:

١-مسحة من العينة المختبرةمن الأعضاء المصابة في حفر الشريحة

٢-نجفف المسحة ونثبتها بالأسيتون و كذلك نجفف الشريحة الحاوية على الشاهد+ و-

٣-نضع قطرة من الأضداد الموسومة في كل حفرة

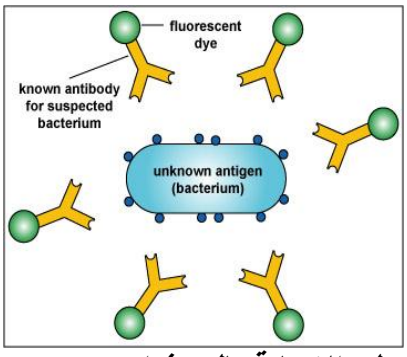
٤-حضن ٣٧مْ مدة ٣٠د

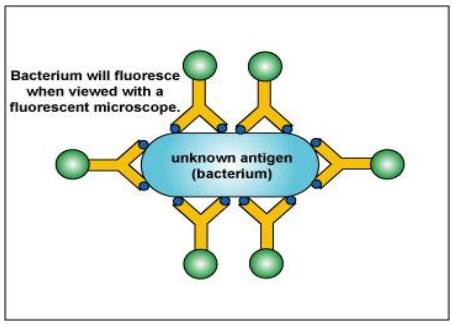
٥-غسيل بمحلول PBSثم نجفف بورقة النشاف

نضع سائل التغطية فوق الحفر ثم نضع ساترة زجاجية ونفحص بالمجهر المتألق X40

النتيجة: (-) عدم تألق

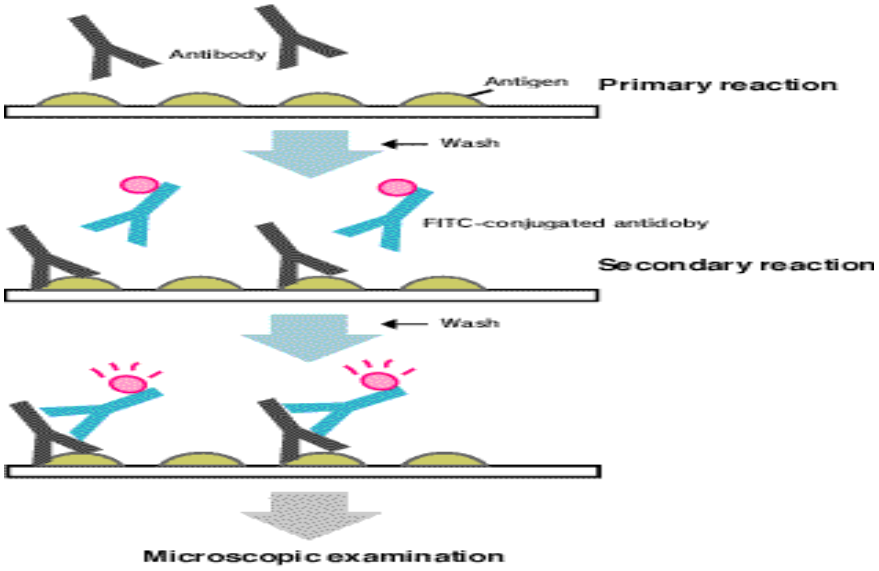
(+)جزيئات متألقة باللون الأخضر





٢- أختبار التألق المناعي غير المباشر للبرهان على الاصابة بالمتدثرات:

تستخدم هذه التقنية للبرهان على الأضداد في المصل المختبر



مخطط يوضح اختبار التألق المناعي غير المباشر

اختبار(ELISA)

- يشبه في مبدأه اختبار التألق المناعي
- لإظهار نتيجة التفاعل بين الضد و المستضد نلجأ لوسم الضد بانزيم لاظهار اللون نضيف كاشف (ركيزة) ونقرأ النتيجة على جهاز قارى الاليزا

المواد للاختبار

- مستضد مثبت في الحفر الصغرية

- الاضداد الموسومة بأنزيم البيروكسيداز
- الركيزة (كاشف لوني)
- محلول ايقاف التفاعل
- أمصال شاهد+ و -

تنفيذ الاختبار

- صب محلول المستضد في الحفر ثم التحضين فيحدث التصاق ثم نغسل لازالة غير المرتبط
- اضافة المصل الختبر للمستضد ثم تحضين ثم غسيل
- اضافة ضد الضد الموسوم ثم نحضن فيحدث ارتباط الكنيوكات مع الضد المرتبط بالمستضد
- غسيل
- اضافة الركيزة فيصبح محتوى الحفر ملون
- نضيف محلول الإيقاف

قراءة النتيجة

- قياس الكثافة البصرية(OD)مستخدمين جهاز قارئ الاليزا طول الموجة ٦٥٠ nm
- تتناسب شدة التلوين طردا مع ضد الغلوبين الموسوم المرتبط بالضد المرتبط بالضد النوعي الموجود في المصل الختبر
- ملاحظة:ا ذا كانت الكثافة البصرية للشاهد – أقل أو تساوي ٠,١٥فالاختبار مقبول وإذا تجاوزته يجب اعادة الاختبار
- تقرأ النتيجة على شكل رقم ٠,٩٤٢ هو الرقم المعبر عن الكثافة البصرية يتم تحويلها من خلال معادلة إلى معيار أضداد

نهاية الاختبارات المصلية

مدرس المقرر

د. مأمون الأمير