البكتريا المرضية (٢) العملي

المختبر الثاني

اعداد

م.م. ارشد مهدي حمد

اساتذة المادة

م.م. أرشد مهدي حمد

م.م. موج صدام زين

م.م. لُبنى أركان

طرق حفظ العينات لحين زراعتها

إن جمع العينات يعتبر الخطوة الأولى والمهمة في عملية التشخيص إلا أن هذا لا يقلل من قيمة الخطوات الأخرى في عملية التشخيص حيث تساعد هذه الخطوات مجتمعة في الوصول إلى نتائج سليمة وقيمة تؤدي في النهاية إلى تحديد الكائن المسبب للمرض ومن الخطوات المهمة التي تلي عملية جمع العينة هي عملية حفظ العينة حتى زراعتها ، إذ انه في بعض الحالات يتعذر التعامل المباشر والسريع مع العينة المرضية لأسباب قد تكون خارجة عن إرادة العامل في المختبر مثل عدم توفير المواد اللازمة للفحص أو الحاجة إلى نقلها إلى تختبر آخر مما يستوجب توفير ظروف ملائمة للعينة حتى تبقى العينة في حالتها الطبيعية ويبقى الكائن الحي الدقيق فيها حياً دون أن يتأثر بالظروف الخارجية وتستخدم في هذه الحالة أوساط زراعية خاصة من اجل حفظ أو نقل العينة حتى تتوفر الظروف الملائمة لزراعتها، وأوساط الحفظ أو النقل maintenance or transport media هي أوساط غذائية تساهم في بقاء الكائن الحي في حالته الطبيعية وحيويته لفترات زمنية طويلة إلا أنها لا توفر النمو المثالي الجيد للكائن الحي الدقيق فيها . وتختلف هذه الأوساط اعتماداً على نوع الكائن الحي المتوقع وجوده في العينة المرضية. ومن البديهي أن الهدف الرئيسي لزراعة العينات المرضية هو تكثير الكائن الحي الدقيق المتوقع وجوده فيها من أجل دراسته والتعرف على صفاته وحتى يتم ذلك لابد من أن يبقى هذا الكائن حياً في العينة محافظاً على حيويته فيها حتى ولو تأخرت عملية الزراعة ولأجل الحصول على نتائج سليمة لعملية حفظ العينات ونقلها حتى زراعتها يفضل اتباع القواعد التالية:

١ - يفضل زراعة العينة مباشرة بعد أخذها من المريض على الوسط المناسب وفي ظروف مناسبة وهذا يعتبر أفضل طريقة للحصول على نتائج سليمة وخاصة لبعض العينات التي لا تتحمل البقاء لمدة زمنية طويلة في الظروف البيئية المحيطة مثل عينات CSF أو إفرازات الأحليل للبحث عن البكتيريا المسببة للسيلان.

٢ - إذا لم تتوفر الظروف المناسبة لزراعة العينة مباشرة فهنالك وقت مسموح به لبقاء الكائن الحي الدقيق حياً في العينة على درجة حرارة الغرفة فمثلاً يفضل زراعة عينة البول خلال ربع ساعة من جمعها بينما عينة البراز تأخذ فترة أكثر بقليل من عينة البول .

٣- توضع العينات في الثلاجة بين ٢-٨ م للمحافظة على حياة الكائن الحي الدقيق فيها لفترة زمنية تتراوح ٣-٢٤ ساعة حيث يتم تثبيط نمو و تكاثر الأحياء الدقيقة فيها لحين زراعتها وتنقل هذه العينات إلى مختبرات أخرى في صندوق مبرد Cooling box على أن تكون عملية الزراعة والنقل ضمن الفترة الزمنية المسموح بها والمحددة أعلاه .

٤- بعض العينات يفضل أن تبقى في درجة حرارة الغرفة ولا توضع في الثلاجة مثلاً لا ينصح بوضع عينات CSF و نخاع العظم Bone marrow و كشطات الجلد Skin scraping و الأظافر والشعر المستخدمة للكشف عن الفطريات الجلدية في الثلاجة ، وإنما تبقي على درجة حرارة الغرفة حتى تتم زراعتها .

٥- يفضل حفظ المسحات Swabs في أوساط سائلة مثل Thyoglycollate broth أوغمسها في الوسط الزرعي الصلب .

٦- في حال صعوبة زراعة العينة خلال الوقت المناسب و اللازم لبقاء الكائن حياً فيها يفضل وضعها في أوساط حفظ ونقل خاصة بكل عينة حتى يتم زراعتها أو وصولها إلى المختبر الخاص وذلك للحفاظ على الجراثيم من الجفاف أو الأكسدة أو التحطيم الذاتي ومن

أكثر أوساط النقل المستخدمة وسط Cary-Blair mediaووسط Amies ووسط Sturat ووسط ماء البيتون القاعدي Pepton water media

٧ - أما العينات التي يتوقع وجود الفيروسات فيها فيتم حفظها في الثلج حتى تتم عملية الزراعة لها مع تجنب تجمدها على اكثر من سالب ٧٠ م أو توضع في أوساط حفظ ونقل خاصة تحتوي على المضادات الحيوية لمنع تكاثر البكتيريا فيها .

++

بيئات النمو Growth Media

تعتمد معظم البحوث الميكروبيولوجية على استعمال بيئات نمو خاصة يمكن تحضيرها مختبرياً. ويمكن تعريف البيئة (Medium) بأنها عبارة عن مجموعة من المواد المتماثلة مع البيئات التي تعيش عليها الميكروبات في الطبيعة، والتي تحتوي غالبا على العناصر الضرورية للنمو مثل الكربون والنيتروجين، بالإضافة إلى بعض العناصر المعدنية. وعموماً فإن معظم الكائنات الحية الدقيقة غير متماثلة في احتياجاتها الغذائية، فهي تختلف اختلافا كبيراً لقدرتها على تكوين ما تحتاجه من المصادر الغذائية. وتنقسم الأوساط الغذائية من حيث التركيب إلى :

١ - أوساط غذائية محددة التركيب الكيميائيChemically Defined Media

وتتركب هذه الأوساط الغذائية من مواد كيميائية عديدة معروفة التركيب تضاف بنسب معينة وتذاب في الماء أيضًا بنسبة معروفة، وتستخدم عادة في الدراسة في معظم المختبرات الميكروبيولوجية، وأهم ما يميز هذه البيئة أنه يمكن تجهيزها بدقة وبنسبة معينة .

٢ - أوساط غذائية غير محددة التركيب الكيميائيChemically Nondefined Media

وتتركب هذه الأوساط من مكونات غير محددة التركيب الكيميائي، وهي عبارة عن مستخلصات نباتية أو حيوانية مثل مستخلص اللحم والدم أو مستخلصات بعض الأنسجة النباتية والحيوانية .

كما يمكن تقسيم الأوساط الغذائية محددة التركيب الكيميائي وغير محددة التركيب الكيميائي حسب القوام إلى : -

١- أوساط غذائية صلبة (Solid media) وهذه يضاف إليها الأجار (Agar).
٢- أوساط غذائية نصف صلبة (Semisolid media) وهذه تحتوى على ربع الكمية من الأجار الذي يضاف إلى البيئات أو الأوساط الغذائية الصلبة .
٣- - أوساط غذائية سائلة (Liquid media) وهذه لا تحتوي على الأجار وتستخدم عادة لعزل الميكروبات بصورة نقية .

كما توجد بيئات ذات أغراض خاصة تعتمد على نوع التجربة والهدف من دراسة الكائن الحي الدقيق، ومنها البيئات الاغنائية (Enriched media) يضاف إليها بعض المركبات الخاصة لجعلها غنية التركيب، كما توجد البيئات الانتخابية (Selective media) وهذه يضاف إليها بعض المواد الكيميائية التي تساعد على نوع معين، وخاصة من الميكروبات دون الأخرى، وهناك البيئات التفريقية (Differential media) وهذه تسمح بالتمييز أو التفريق بين نمو المجاميع الميكروبية المختلفة، بالإضافة إلى السابق توجد بيئات التقدير الحيوي (Biology assay media) وهذه عبارة عن نوع خاص ومحدد من بعض المواد الكيميائية تستعمل في أغراض خاصة مثل التقدير الكمي الحيوي لنوع معين من الفيتامينات أو الأحماض الأمينية. كما توجد بيئات التعرف على الكائنات الحية (Media for characterization of microorganism) الدقيقة بصفة خاصة وعند تحضير البيئات أو الأوساط الغذائية السابق ذكرها لا بد من قياس وتعديل الرقم الهيدروجيني للبيئة (pH) وعمومًا فقد وجد أن معظم الفطريات تفضل النمو على البيئات المتعادلة أو التي تميل إلى الحموضة (pH = ٦-٧) أما البكتيريا فتفضل النمو على البيئات القريبة من درجة التعادل أو المتعادلة (pH = ٧-٨) . ويمكن قياس الرقم الهيدروجيني لأي وسط غذائي بواسطة جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH meter)