

التحضيرات المجهرية

الشامل في

التحضيرات المجهرية

إعداد وتأليف

أ.م.د. منى صلاح رشيد الحمداني

أ.د. عدنان موسى محمد عثمان
أ.م.د. هيثم لطيف عبد الهادي صكر الكبسي
أ.م.د. بنان راكان عبد العزيز دبدوب
م.د. سجي حسين دلفي سالم
م.د. نورس نجاح مبارك
م.م. رفسل فراس جابر
أ.د. مصطفى رشيد مجيد القيسي
أ.د. إنعام محمود نجم الربيعي
م.د. فوز عبد السلام خليل الصفار
أ.م. صادق صبيح كريم الطائي
م.م. شهد قاسم محمد الحمداني
م.م. نور نعيم شاكر محمود



خلاصة الكتاب:

تضمن هذا الكتاب اثنا عشر فصلاً تناول في طياته قدر المستطاع نظرة شاملة لأساسيات التحضيرات والفحوصات والاختبارات المجهرية لمختلف الكائنات الحية (الحيوانية والحشرية والنباتية و الأحياء الدقيقة) يغطي الكتاب أساسيات التحضير النسيجي والمجهري وتقنيات الصبغ والتلوين والتعرف على أساليب تشخيص الأمراض المختلفة. يسلط الكتاب أيضاً الضوء على أحدث التطورات في مجال المجاهر الإلكترونية وكيفية استخدامها في التحليل الدقيق لعينات النسيجية. كما يشرح الكتاب البرامج الحاسوبية المتقدمة التي تستخدم في تحليل البيانات، مما يسهم في زيادة الدقة والفعالية في الفحص. يحتوي الكتاب على أمثلة توضيحية ودراسات توضح كيفية استخدام هذه التقنيات في مجال الطب والأبحاث العلمية. يعد هذا الكتاب مرجعاً قيماً للعلماء والأطباء والباحثين الذين يهتمون بالتحضيرات النسيجية والمجهرية والاختبارات والفحوصات والتحليل التشخيصية والطب الشرعي وعلوم النبات والاعذية باستخدام المجهر الضوئي والمجهر الإلكتروني والبرامج الحاسوبية التي تساعد في تحليل الصور المجهرية واستخلاص المعلومات الكمية. يتطرق الكتاب أيضاً إلى أساسيات تقنيات الفحص والتحليل الجزيئي والجيني وتحديد العوامل الوراثية.

ISBN : 978-9922-707-03-7



9 789922 707037



بغداد-شارع المتنبلي
سوق الوراقين
0770 048 8780
0780 074 0728



الشامل في التحضيرات المجهريّة

الشامل في التحضيرات المجهرية

تأليف

أ.م.د. منى صلاح رشيد الحمداني

أ.د. عدنان موسى محمد عثمان أ.د. مصطفى رشيد مجيد القيسي

أ.م.د. هيثم لطيف عبد الهادي صكر الكبيسي أ.د. إنعام محمود نجم الربيعي

أ.م.د. بنان راكان عبد العزيز دبذوب م.د. فوز عبد السلام خليل الصفار

م.د. سجي حسين دلفي سالم أ.م.صادق صبيح كريم الطائي

م.د. نورس نجاح مبارك م.م. شهد قاسم محمد الحمداني

م.م. رفل فراس جابر م.م. نور نعيم شاكر محمود

جميع الحقوق محفوظة للمؤلفين
لا يجوز نسخ أو طباعة الكتاب أو
جزء منه أو نشره إلكترونياً
إلا بإذن من المؤلفين

قائمة المحتويات

5	المحتويات.....
7	محتويات الصور والاشكال.....
11	المقدمة.....
13	الفصل الأول: التحضيرات المجهرية للانسجة الحيوانية.....
14	التحضيرات المجهرية الاعتيادية او الروتينية.....
19	الملونات الخاصة.....
19	- ملون ماسون الثلاثية.....
23	- صبغة PAS (Periodic Acid Schiff).....
26	تحضير الاجنة وطرق دراسة التشوهات الجنينية.....
26	التأثيرات التيراتوجينية وتشوهات الهيكل العظمي باستخدام التلوين المزدوج للهيكل العظمية.....
29	الفصل الثاني: الكيمياء النسجية المناعية.....
29	تطبيقات تقنية الكيمياء النسجية المناعية.....
30	طرق التصبغ الكيميائي المناعي النسيجي.....
32	طريقة PAP.....
32	طريقة مركب أفيدين - بيوتين (ABC).....
33	طريقة (LSAB).....
45	الفصل الثالث: علم وظائف الأعضاء.....
45	انواع العينات التي تؤخذ من المرضى.....
45	الدم.....
45	البول.....
46	البراز.....
46	السائل المنوي.....
46	عينات أخرى.....
50	حفظ الدم.....
54	وظائف الدم.....
55	كرات الدم الحمراء.....
57	الصفائح الدموية (خلايا التخثر).....
58	طريقه سحب الدم.....
60	تحاليل الدم.....
60	عدد خلايا الدم البيضاء (WBC).....
68	عدد الخلايا الدم الحمراء (RBC).....
73	نسبة الهيموجلوبين.....
74	عدد الصفائح الدموية.....
80	تحليل ESR وطريقة العمل.....
82	Widal test اختبار السالمونيلا (اختبار فيدال).....
84	اختبار الكشف عن الخلايا المنجلية.....
86	تقنية الاليزا (ELISA).....
89	جهاز التحليل الطبي.....
94	تقدير تركيز الكلوكون في مصل الدم.....
95	تقدير تركيز الكولسترول في مصل الدم.....
96	تقدير تركيز الكليسريدات الثلاثية.....
97	تقدير تركيز البروتينات الدهنية عالية الكثافة للكولسترول في مصل الدم.....

97	تقدير تركيز البروتين الكلي.....
100	تقدير تركيز الألبومين في مصل الدم.....
101	تقدير تركيز اليوريا في مصل الدم.....
102	تحليل الكرياتينين.....
103	تقدير تركيز حامض اليوريك في مصل الدم.....
103	تقدير فعالية الانزيمات الناقلة للألمين GOT و GPT.....
104	تقدير تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم.....
106	تقدير تركيز المألون ثنائي الديهايد في مصل الدم.....
107	تقدير فعالية إنزيم (SOD).....
111	الفصل الرابع: فَمُ الدَّم
111	خلايا الدم الحمر.....
113	خلايا الدم البيضاء.....
114	الصفائح الدموية.....
115	تحضير أغشية الدم على الشرائح.....
125	الفصل الخامس: الفحص المباشر لعينات الطفيليات
125	عينات البراز.....
134	فحص الطفيليات في الدم.....
136	فحص سوائل البول أو الجسم.....
137	فحص الأنسجة.....
137	فحص البلغم.....
145	الفصل السادس: جمع وحفظ الحشرات
145	طرق تجميع وحفظ الحشرات.....
152	قتل الحشرات.....
163	الفصل السابع: عزل وتشخيص الفطريات
166	عزل الفطريات من التربة.....
168	عزل الفطريات من الهواء.....
168	عزل الفطريات من الماء.....
169	عزل الفطريات الممرضة للنبات.....
170	عزل الفطريات الممرضة للإنسان والحيوان.....
173	الفصل الثامن: طرق فحص الخلايا والأنسجة النباتية
176	تحضير المقاطع الدائمة والمؤقتة للعينات النباتية.....
183	الفصل التاسع: المجهر الإلكتروني
184	المجهر الإلكتروني الماسح.....
186	تحضير العينات.....
187	العينات الحياتية.....
188	استخدام المجهر الإلكتروني الماسح لأغراض تصوير أنسجة حيوانية مختلفة.....
191	استخدام المجهر الإلكتروني الماسح لأغراض تصوير عينات نباتية مختلفة.....
197	المجهر الفلوريستنت.....
201	الفصل العاشر: علم الأحياء الدقيقة
201	شروط السلامة العامة في مختبرات الأحياء الدقيقة.....
202	التعقيم.....
203	التطهير.....
209	أشكال البكتيريا ونظام تجميعها.....
209	الشكل المورفولوجي للبكتيريا.....
213	الأوساط الزرعية.....
219	تنمية الجراثيم على الأوساط الزرعية.....
221	الصبغات الميكروبية.....

224	عزل البكتيريا
226	تشخيص البكتيريا
230	الحفظ
233	الفصل الحادي عشر: قياس عدد وابعاد الخلايا المجهرية باستخدام الأدوات اليدوية والبرامج الحاسوبية
235	القانون العام لحساب كثافة الخلايا
237	قياس ابعاد الشرائح المجهرية عن طريق مقياس محدد
249	الفصل الثاني عشر مقدمة عن البيولوجي الجزيئي
250	الحامض النووي منقوص الاوكسجين
251	الحامض النووي الريبي (RNA)
252	البروتينات
252	التشخيص الجزيئي
252	الاجهزه والمعدات مطلوبة في مختبر التشخيص الجزيئي
257	التقنيات البيولوجيا الجزيئية الشائعة
258	طرق تحطيم الخلايا
263	استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين
277	استخلاص الحمض النووي الريبي RNA من عينات الدم
279	تفاعل البلمرة المتسلسل

قائمة الصور والاشكال

17	صورة (1-1) المايكروتوم الدوار
17	صورة (2-1) القوالب
18	صورة (3-1) المقاطع الملونة بالملونات الروتينيه بعد التحميل النهائي
18	صورة (4-1) (كوبلن جار) جار التلوين بحجمين مختلفين
18	صورة (5-1) المجهر الضوئي ذو الشاشة الرقمية للفحص والتصوير
19	صورة (6-1) الشكل النهائي لعينة كلية بعد التلوين بالملونات الروتينيه H&E
22	صورة (7-1) لجلد حيوان زاحف ملون بالملون الثلاثي لماسون Trichrome masson stain
24	الصور (8-1) مأخوذة بواسطة المجهر الضوئي الاعتيادي لنسيج الطحال بقوة تكبير 10x، 40x، 4x على التوالي
25	الصور (9-1) مأخوذة بواسطة المجهر الضوئي الاعتيادي للأنسجة للمفاوية المتبعثرة في الرئة
30	شكل (1-2) : شكل تخطيطي يوضح مواقع الارتباط epitopes على سطح المستضد Antigen
31	شكل (2-2) : شكل تخطيطي يوضح الفرق بين الطريقة المباشرة (A) والطريقة غير المباشرة (B)
32	شكل (3-2) : شكل تخطيطي يوضح طريقة Peroxidase anti-peroxidase method
33	شكل (4-2) : شكل تخطيطي يوضح طريقة Avidin-Biotin Complex
34	شكل (5-2) : شكل تخطيطي يوضح طريقة Labeled StreptAvidin Biotin
35	شكل (6-2) : مخطط يوضح الخطوات الرئيسية لتقنية التصبغ النسيجي المناعي IHC

39	Imunohistochemistry	شكل (7-2):رسم تخطيطي يوضح الخطوات الاساسية للتصبيغ النسيجي المناعي
39		الصورة (8-2):مراحل اعداد العينة المأخوذة من قوالب الشمع.
40	Antigen retrieval	الصورة (9-2):
40	Humidity chamber	الصورة (10-2):
41	(EGFR)Epidermal growth factor receptor	الصورة (11-2):التصبيغ المناعي النسيجي لمستقبلات عامل نمو البشرة
41	Vascular endothelial growth factor(VEGF	الصورة (12-2):التصبيغ المناعي النسيجي لعامل نمو بطانة الاوعية
58		شكل (1-3) مخطط تكوين الدم.
61		صورة(2-3) معدات سحب الدم.
63		شكل (3-3) رسم تخطيطي يوضح طريقة العد.
66		الصورة (4-3) اشكال كريات الدم البيض
68		صورة (5-3) شريحة عد كريات الدم.
76		صورة(6-3) جهاز ساهلي.
82		صورة (7-3) أجهزة طريقة ويسترجرين
112		شكل (1-4) خصائص كريات الدم الحمراء
116		شكل رقم (2-4)وضع قطره من الدم على سلايد.
117		شكل رقم (3-4)توزيع قطره الدم.
117		شكل رقم (4-4)ندفع الموزع بحركة خفيفة.
118		شكل رقم (5-4) طبقة رقيقة على شكل لسان
118		شكل (6-4) طريقة عمل مسحة الدم.
119		شكل رقم (7-4) شكل سلايد الدم.
120		الشكل (8-4) أفلام الدم على الشرائح.
146		شكل (1-6) يوضح الأدوات المستخدمة في التجميع.
147		شكل (2-6) طريقة اعداد شبكة الحشرات
148		شكل (3-6) شبكة الضرب على الأشجار
148		شكل (4-6) نوعين من الشافطات الزجاجية.
149		شكل (5-6) رسم تخطيطي لمصيدة ضوئية.
150		شكل (6-6) – المصائد اللاصقة.
151		شكل (7-6) مصائد الاطباق المائية.
151		شكل (8-6) – المصائد المستورة.
152		شكل (9-6) – قمع.
153		شكل(10-6) زجاجة قتل الحشرات.
154		شكل (11-6) مواضع مختلفة لتثبيت الدبابيس في الحشرات.
155		شكل (12-6) – تحميل على قصاصة ورقية.
155		شكل (13-6) – التحميل المزدوج.
156		شكل (14-6) – التصليب الفردي للحشرات.
157		شكل (15-6) منفاخ تحنيط البيرقات.
160		شكل (16-6) – يوضح طريقة اعداد العينة على الشريحة المجهرية
163		شكل رقم(1-7): اشكال الفطريات المختلفة.
164		شكل رقم (2-7) : تركيب الخلية الفطرية.
165		شكل رقم(3-7) : الانواع المختلفة للسبورات الفطرية.

167	شكل رقم (7-4) : طريقة التخفيف لعزل الفطريات من التربة.
174	شكل (8-1) يوضح خطوات عمل شريحة بصل مؤقتة.
175	شكل (8-2) خلايا البشرة الاعتيادية والثغور محضرة باستخدام محلول جفري.....
176	شكل (8-3) تحضير وتثبيت القمم النامية في جذور البصل.
178	شكل (8-4) جهاز المشراح الدوار Microtome.....
179	شكل (8-5) مقاطع نسيجية محضر بطريقة التقطيع بجهاز المشراح الدوار Micrtome
184	شكل (9-1)المجهر الالكتروني الماسح.
186	شكل (9-2) لحبوب اللقاح مأخوذة بواسطة المجهر الالكتروني الماسح.....
190	(صورة 9-3): مظهر سطحي للطحال مأخوذ بواسطة المجهر الالكتروني الماسح....
190	(صورة 9-4): مظهر سطحي للطحال مأخوذة بواسطة المجهر الالكتروني الماسح...
191	(صورة 9-5): A و B توضحان الثغور الطحالية.....
191	لوحة (9-6) اسطوانة معدنية متخصصة Metal stup.....
192	لوحة (9-7) جهاز طلاء Sputtering chamber.....
192	لوحة (9-8) : SEM.....
193	لوحة (9-9) :صور لبشرة اوراق الجنس Minuartia
193	لوحة (9-10) :صور لبشرة اوراق الكأي للجنس Minuartia
194	لوحة (9-11): صور المظهر الخارجي لبذور بعض انواع الجنس Minuartia.
194	لوحة (9-12) :صور المظهر الخارجي لبذور توضع اشكال الزخارف على السطح
196	لوحة (9-13) : صور المظهر الخارجي لحبوب لقاح والزخارف على سطح الحبة
198	(صورة 9-14): مأخوذة بواسطة المجهر المتألق Fluorescent microscope لنسيج الطحال.....
198	(صورة 9-15) : مأخوذة بواسطة المجهر المتألق Fluorescent microscope للنسيج اللوز الاعورية.....
199	(صورة 9-16) : مأخوذة بواسطة المجهر المتألق Fluorescent microscope للنسيج اللوز الاعورية.....
199	(صورة 9-17) مأخوذة بواسطة المجهر المتألق Fluorescent microscope للنسيج للمفاوي في الرئة.....
204	شكل (10-1) التعرض الى لهب بنزن.....
206	شكل (10-2) المؤصدة.....
207	شكل (10-3) مرشحة.....
210	شكل (10-4) اشكال الخلايا.....
212	شكل (10-5) بكتريا عصوية.....
213	شكل (10-6) البكتريا الحلزونية.....
213	شكل (10-7) البكتريا الخيطية.....
214	شكل (10-8) أنواع الأوساط.....
216	شكل (10-9) وسط ماکونكي لجهة اليمين المخمر للاكتوز في Escherichia coli ولجهة اليسار غير مخمر للاكتوز في (proteus mirabilis)
223	شكل (10-10) البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.....
224	شكل (10-11)تركيب الجدار الخلوى فى البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام.....
225	شكل (10-12) عزل البكتريا بطريقة الأطباق المخطوطة.....
226	شكل (10-13) عزل البكتيريا بطريقة التخفيف.....
229	شكل (10-14) جهاز الفايترك.....

234	صورة (1-11) شريحة العد Hemocytometer
	شكل (2-11) يوضح ابعاد المربعات الموجودة على شريحة العد
234	Hemocytometer
237	شكل (3-11). يوضح أنواع المربعات الموجودة على شريحة العد.....
238	صورة (4-11) .Stage micromete
238	صورة (5-11) .Ocular micrometer
241	صورة (6-11). شريحة العد.....
	شكل (7-11). هكذا تظهر الصور تحت المجهر باستعمال شريحة العد
241	Haemocytometer
	شكل (8-11). هكذا تظهر الصور تحت المجهر باستعمال شريحة العد
242	Haemocytometer
242	صورة (9-11). يوضح نتيجة قياس عرض الخلية.....
	صور (10-11). توضح جهاز العد تحت المجهر تحت القوة X10 بدون العدسة
243	المدرجة Ocular Micrometer
	صور (11-11). توضح جهاز العد تحت المجهر تحت القوة X10 مع العدسة
243	المدرجة Ocular Micrometer
	صور (12-11). توضح جهاز العد تحت المجهر تحت القوة X40 بدون العدسة
243	العينية المدرجة Ocular
243	صور (13-11). توضح جهاز العد تحت المجهر تحت.....
	صورة (14-11) . توضح معايرة البرنامج من خلال اضلاع المربع لشريحة العد
	المجهري Hemocytometry نوع Improved Neubauer وتقدير ابعاد
244	الابواغ.....
249	الشكل (1-12) (الجزيئات البيولوجية الرئيسية للكائن الحي).....
251	الشكل (2-12): تركيب DNA.....
254	الشكل (3-12) مكونات جهاز الترحيل الكهربائي.....
258	الشكل (4-12) (السحق الالي (الهاون والمدقة)
259	الشكل (5-12) التفسير الميكانيكي.....
260	الشكل (6-12) الموجات فوق الصوتية.....
281	الشكل (7-12): خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل.....

المقدمة

يعد علم التحضيرات المجهرية علم واسع ويضم الكثير من المجالات مثل التحضيرات المجهرية للانسجة الحيوانية، النباتية، والمجهرية بصبغاتها الخاصة وتحضيراتها المختلفة ومتطلبات كل نسيج وكل كائن والمواد اللازمة لذلك، وأنواع المجاهر مثل المجهر الضوئي والفلورسنت إضافة الى المجاهر الالكترونية وقياس عدد وابعاد الخلايا المجهرية باستخدام الأدوات اليدوية والبرامج الحاسوبية، لذلك كانت الحاجة لاتمام كتاب يشمل كل هذه المتطلبات لتسهيل الحصول على المعلومات الخاصة بكل مجال وطرائق العمل والمواد المستعملة ويصبح في متناول اليد.

تضمن الكتاب اثنا عشر فصلا واشتمل كل فصل على مجموعة ثوابت ومواد وطرق عمل، ففي الفصل الأول تناول طرق التحضيرات المجهرية الاعتيادية للانسجة الحيوانية وبعض الصبغات الخاصة إضافة الى طرق تحضير ودراسة الاجنة، اما الفصل الثاني فتضمن التحضيرات المناعية النسجية الكيميائية، الفصل الثالث عن علم وظائف الأعضاء وطرق معالجاتها بالمواد الكيماوية والأجهزة الخاصة، الفصل الرابع تضمن علم الدم وطرق فحص مكونات الدم واشكاله، الفصل الخامس تضمن فحص عينات الطفيليات بانواعها وطرق تلوينها وحفظها، الفصل السادس طرق جمع وحفظ الحشرات وتضمن شرح وافي لكل طرق الجمع والتحضير للحفظ معززا بالصور التوضيحية، الفصل السابع عزل وتشخيص الفطريات من اماكنها التي تنمو فيها وتنميتها ليسهل تشخيصها، الفصل الثامن تضمن طرق فحص الخلايا والأنسجة النباتية سواء كانت طرق دائمية او مؤقتة، الفصل التاسع المجهر الالكتروني وكذلك استعمال المجهر الالكتروني الماسح في تصوير العينات النباتية والحيوانية، الفصل العاشر تضمن الاحياء المجهرية وانواعها وطرق عزلها وتشخيصها والاعتماد على الزراعة المناسبة وطرق تفريق البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام إضافة الى بعض الطرق الأخرى، الفصل الحادي عشر تضمن قياس عدد وابعاد الخلايا المجهرية باستخدام الأدوات اليدوية والبرامج الحاسوبية سواء كانت خلايا فطرية او ابواغ او بكتريا او حيوانات منوية او بعض الخلايا الحيوانية والنباتية بطرق متطورة مدعمة بالصور التوضيحية، الفصل الثاني عشر تضمن موجز عن الاحماض النووية وطرق الاستخلاص والعزل والتنقية والترحيل.

انجز هذا الكتاب بجهود مجموعة تدريسيين يحملون شهادات والقاب علمية وخبرات تؤهلهم الى انجاز هذا العمل المتواضع الذي جائت فكرته لطرح خبراتهم على مدى تجارب وخبرات واعوام طويلة وكل عمل لا يخلوا من بعض الهفوات التي قد تغيب عن المؤلفين نستقبل ملاحظاتكم بكل امتنان لتصويب ما اخطأنا به في طبعتنا الأولى ونرجو ان يكون عوناً للباحثين والطلبة ومن الله التوفيق.

المؤلفين

الفصل الاول

التحضيرات المجهرية للانسجة الحيوانية Microscopic preparation

د. منى صلاح رشيد

ان التحضيرات المجهرية للانسجة هي عملية معقدة ودقيقة وهي ذات أهمية كبيرة في الحياة العملية والبحثية والتشخيصية فهي تعتبر الأساس الأول لتشخيص المرض لذا كانت هذه التحضيرات المجهرية ذات أهمية كبيرة في الجانب الطبي والبحثي الى وقتنا هذا وتقسم التحضيرات المجهرية الى قسمين :

1- تحضيرات لا مقطعية Non-sectioning methods : وهي عملية تحضير شريحة نسجية دون الحاجة الى عمل مقطع منها وهي على أنواع:

أ- التحميل الكلي whole mount : ويتم فيها وضع العينة بأكملها على الشريحة الزجاجية وفحصها مثل بعض أنواع الحشرات واللافقریات.

ب- عمل مسحات smearing methods : وهي عملية اخذ مسحة من بعض السوائل الجسمية مثل اللعاب والبلغم والدم وغيرها.

ت- النثر او النشر teasing methods : وهي عملية اخذ عينة مثل العضلة ثم تفكيكها واخذ الالياف العضلية وفحصها

ث- السحق او الهرس squashing methods : وتستعمل لسحق الانسجة وتحويلها من الحالة النسجية الى الحالة الخلوية على شريحة زجاجية مثل دراسة مراحل الانقسام الخلوي ومشاهدة الكروموسومات

ج- طريقة التفكيك بالنقع maceration methods : وهذه تستعمل مع الحبوب النباتية الجافة

2- التحضيرات المقطعية sectioning methods : عملية تحضير شريحة نسجية بمقاطع رقيقة وبمستويات مختلفة لغرض دراستها وتكون المقاطع عرضية transverse or cross sections او مقاطع طولية longitudinal sections او قد تكون هذه المقاطع مائلة oblique sections.

وتستخدم لهذا الغرض أجهزة خاصة تسمى بالمشرّاح او المايكروتوم microtome وكل مايكروتوم يكون خاص بنوع معين من التحضيرات الا اننا سنتحدث عن ابسطها استعمالا وأكثرها شيوعا وارخصها سعرا وهو المايكروتوم الدوار او اليدوي rotary or hand microtome .

التحضيرات المجهرية الاعتيادية او الروتينية Normal or routine stain

في هذا الجزء سنقوم بشرح تفصيلي للطرق المتبعة في التحضيرات الاعتيادية وسميت بالاعتيادية لأستخدام الصبغات الشائعة وهي الهيماتوكسيلين هارس والايوسين المصفرة.

وتكون الخطوات كما يلي:

1- جمع العينات وهي اما تكون من خزعة مأخوذة من عضو معين او حيوانات مختبرية تعرضت لتجارب معينة

2- التثبيت fixation: وتتم هذه العملية بعد الحصول على العينات سواء بأخذ خزعة او قتل الحيوان وتشريحه واخذ الجزء المطلوب ،توضع العينات في محلول التثبيت ويستعمل في هذه الحالة محاليل التثبيت ومن أشهرها الفورمالين 10% ويحضر بالطريقة التالية:

يؤخذ 10 مل من الفورمالدهايد تركيزه 37-40% ويخفف بواسطة 90 مل من ماء الحنفية الجاري ليصبح لدينا 10% فورمالين

توضع العينة في محلول التثبيت لمدة 18-24 ساعة ولا يفضل زيادة مدة التثبيت عن ذلك الا اذا كان العضو يحتاج الى ذلك لكبر حجمه او لصلابته او ببطء توغل المحلول فيه ويفضل في هذه الحالة تقطيع العضو الى أجزاء صغيرة في حالة كونه لا يحتاج الى دراسته بشكل كامل او بقطاعات محددة وتكون نسبة حجم العينة الى حجم المثبت 1:20.

3- الغسل washing: بعد التثبيت يجب غسل العينات بالماء الجاري tap water لمدة نصف ساعة ثم بالماء المقطر distal water لمدة نصف ساعة أخرى وفي حالة كون العينات وضعت في محلول التثبيت لمدة تزيد عن المدة المقررة تزيد مدة الغسل عن الوقت المحدد وذلك للتخلص من محلول التثبيت .

وهنا يجب ان ننوه الى ان هناك محاليل تثبيت أخرى تستعمل لهذا الغرض مثل مثبت كارنوي وبوين والكحولات وحامض الخليك وحامض البكريك ويجب غسل العينة في محلول يتلائم مع محلول التثبيت ففي حالة الفورمالين 10% يستعمل الماء الجاري ثم الماء المقطر لكون الفورمالين مخفف بالماء المقطر اما في حالة استعمال محاليل أخرى مخففة بالكحول مثلا فتغسل العينات بالكحول وحسب نسبة الكحول المستعملة.

4- الانكاز او سحب الماء dehydration: وهي عملية إحلال المواد الخاصة بالانكاز تدريجيا محل مواد التثبيت ويستعمل في هذه الطريقة الكحول الايثيلي بتركيز تصاعدي وتبدأ من 70% كحول (وممكن ان يتم

حفظ العينة في هذا المحلول لمدة طويلة شرط عدم تبخر المحلول من العينة بوضع العينات في علبة محكمة الغلق فتسمى هذه العملية بعملية الحفظ (preservation) ثم بتركيز 80% ، 90% و 96% و 100% لمدة 30 دقيقة – 3 ساعات وتكرر الخطوة الأخيرة مرتين لضمان سحب الماء نهائيا من العينة .

5- الترويق clearing: وهي عملية إحلال محاليل تمتزج بالكحول من جهة وبمحاليل التشريب والطر من جهة أخرى وتجعل العينة أكثر نفاذية للضوء أي شفافة تقريبا ويمكن ملاحظة ذلك عند رفع العينة في الضوء حيث يلاحظ شفافيتها حيث توضع العينة في محلول الزايلول او الزايلين لمدة 30 دقيقة – 3 ساعات وتكرر العملية لضمان الاحلال الكامل وتعتمد على نفاذية العينة وكذلك على نوع الزايلول المستعمل وذلك لأختلاف الفاعلية من علامة تجارية الى أخرى وكذلك تعتمد على حجم العينة والجزء المستعمل ودرجة حرارة المحيط .

6- التشريب infiltration: ويتم خلال هذه العملية توغل او تشريب العينة بمحلول اخر يمكنه الامتزاج مع الزايلول السابق الذكر وهو شمع البارافين الذي يكون على شكل بلورات وتكون درجة انصهاره 58-60 درجة مئوية وهو من النوع المتوسط الصلابة ، ويتم وضعه في الفرن الكهربائي على درجة 58-60 درجة مئوية لحين الانصهار ، وتتم عملية التشريب اما بوضع حجمين متساويين من الزايلول وشمع البارافين لنصف ساعة في الفرن الكهربائي او بوضع العينة في شمع البارافين المنصهر لمدة نصف ساعة مع ملاحظة عدم ارتفاع درجة الحرارة لضمان عدم تلف العينة من جهة وعدم تلف البارافين بدرجات الحرارة العالية من جهة أخرى.

ويجب الإشارة هنا الى ان هناك محاليل أخرى للتشريب والطر تحتاج الى محاليل أخرى حسب امتزاجها بالمواد مثل التشريب والطر بالسليدين وكذلك طريقة التجميد والأخيرة لا تحتاج الى التمرير بهذه المحاليل السابقة لكون هذه المحاليل تؤدي الى اتلاف او تحلل الانزيمات والمواد الحيوية والدهون وغيرها من المواد داخل الخلية مما يعيق عملية تشخيصها او دراستها، وقد ذكرنا بشيء من التفصيل طريقة تحضير العينات النسجية بواسطة شمع البارافين لسهولة الحصول وتوافر المواد المستعملة فيها

7- الطمر embedding: يكون الطمر بوضع العينة في قوالب خاصة اما على شكل L- shape او قوالب stainless steel باحجام مختلفة او بواسطة قوالب فولاذية سهلة الفتح وتركها لتتصلب بدرجة حرارة الغرفة او في الثلاجة او على صفيحة باردة ثم فصلها عن القالب مع تعليمها بوضع

علم مكتوب عليه المعلومات الخاصة بكل عينة وكما مكتوب سابقا على علبة العينة .

8- التشذيب trimming: هي عملية إزالة الشمع المحيط بالعينة مع عدم المساس بالعينة لتسهيل عملية التقطيع فيما بعد.

9- التقطيع sectioning: يتم عمل مقاطع رقيقة جدا بسمك 5-7 مايكروميتر وذلك بواسطة جهاز التقطيع المسمى المشراح الدوار او اليدوي بوضع العينة على الجزء الخاص بتثبيتها وتقريب الشفرة او سكين القطع والبدء بالتقطيع على شكل شريط ribbon متسلسل من المقاطع الرقيقة الحاوية على العينات ويتم رفع العينات اما بملقط او بواسطة عود خشبي ووضعه في حمام مائي بدرجة حرارة 40 درجة مئوية للتخلص من الطيات المحتمل حدوثها في الشريط.

يتم تحضير البومين ماير خاصة للمبتدئين في العمل ويحضر بالطريقة التالية:

يؤخذ حجم من الكليسيرين او الكليسيروول مع حجم مساوي له من الالبومين او بياض البيض وترشح بعدة قطع من الشاش ثم توضع في علبة محكمة الغلق وتوضع عليها 2-4 بلورات من الثايمول لمنع التعفن او توضع في الثلاجة لحين الاستعمال.

توضع مسحة خفيفة جدا من البومين ماير على شريحة زجاجية بواسطة الاصبع او فرشاة او اعواد تنظيف الاذن ثم يتم إرساء الشريط على الشريحة بانزال الشريحة الزجاجية تحت العينة في الحمام المائي بزواوية حادة ثم تقريب الشريحة من العينة ووضعها عليها.

10- التلوين staining: في حالة الألوان الاعتيادية يستعمل ملونين شائعين لهذا الغرض وهي الهيماتوكسيلين هارس Harris Haematoxyline و الايوسين المصفرة Eosin yallwish . حيث تعمل صبغة الهيماتوكسيلين هارس على صبغ الأجزاء الحامضية وهي النواة باللون البنفسجي لكونها صبغة قاعدية اما الايوسين فهي تقوم بصبغ الساييتوبلازم باللون الأحمر او الوردي لكونها صبغة حامضية تصبغ الأجزاء القاعدية من الخلية.

وتتم بالطريقة التالية

1- توضع الشرائح في جارات خاصة (coplen jar) بعد تجفيفها على صفيحة ساخنة او بدرجة حرارة الغرفة ويتم وضعها في الزايلول لمدة خمس دقائق لضمان إزالة الشمع عن العينة

2- توضع في تركيز تنازلي من الكحول الايثيلي 100%، 96%، 90%، 80%، و 70% لمدة خمس دقائق مع التأكيد على وضع العينة في ال 100% مرتين.

- 3- توضع العينات في ملون الهيماتوكسيلين هارس لمدة 30 ثانية -3 دقائق حسب تركيز الملون والشركة المصنعة.
- 4- تغسل بالماء الجاري لمدة ربع ساعة الا ان يصبح ماء الغسل نظيف من الملون ثم توضع في الماء المقطر لمدة خمس دقائق .
- 5- اذا كان ملون الايوسين المصفرة مائي توضع الشريحة في الملون مباشرة ،اما في حالة كون الملون كحولي فتوضع الشريحة أولا في الكحول 70% ثم توضع في الايوسين وتعتمد المدة اللازمة للتلوين على تركيز الملون والشركة المصنعة وهي بين 5-15 دقيقة تقريبا لكن يجب تجريب الملونين على شريحة اختبارا ولا.
- 6- توضع العينة في تركيز تصاعدي من الكحول الايثيلي 70% ، 80% ، 90% ، 96% و 100% وتكرر الخطوة الأخيرة مرتين ولكل خطوة خمس دقائق.
- 7- توضع العينات في الزايلول خمس دقائق
- 8- يوضع محلول التحميل على الشريحة وهو اما كندا بلسم او DPX ويوضع فوقه غطاء الشريحة ويترك ليحفظ بدرجة حرارة الغرفة وفي حالة وجود فقاعات يتم الضغط على غطاء الشريحة برفق لتخرج الفقاعات منها بواسطة الملقط او بعود خشبي.
- ملاحظة / في حالة حدوث فرط التلوين over stain يتم تحضير كحول محمض بوضع قطرات من حامض الخليك على كحول ايثيلي 70% ووضع الشريحة بتغطيسها واخراجها لعدة مرات ولثواني وتسمى هذه العملية tipping.
- 9- الفحص والتصوير: يتم فحص الشرائح بواسطة المجهر الضوئي وقرائنها ومن ثم تصويرها بواسطة مجهر ضوئي ذو شاشة رقمية



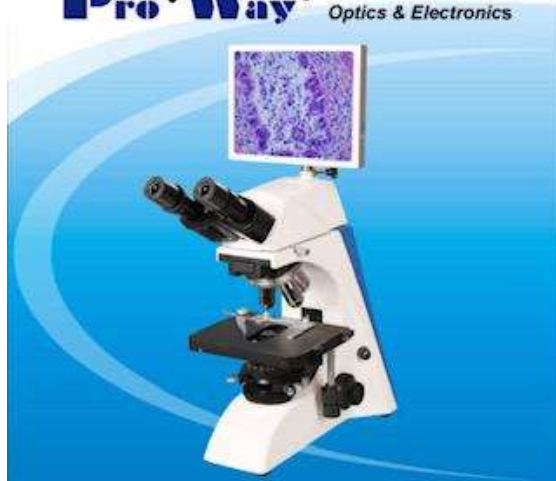
صورة (1-1) المايكروتوم الدوار صورة (2-1) القوالب



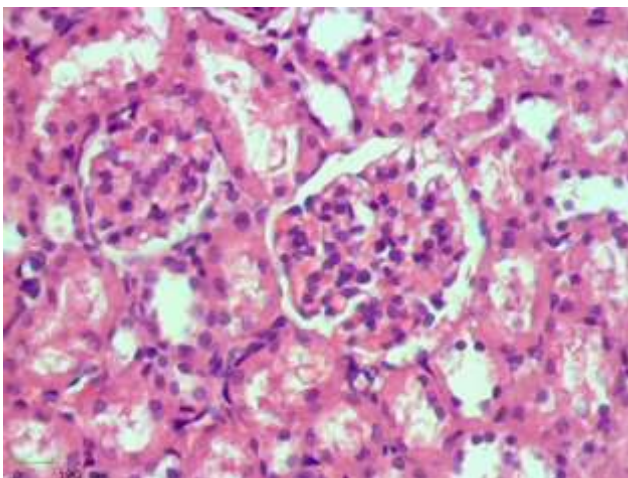
صورة (3-1) المقاطع الملونة بالملونات الروتينية بعد التحميل النهائي



صورة (4-1) (كوبلن جار) جار التلوين بحجمين مختلفين



صورة (5-1) المجهر الضوئي ذو الشاشة الرقمية للفحص والتصوير



صورة (1-6) الشكل النهائي لعينة كلية بعد التلوين بالملونات الروتينية H&E

الملونات الخاصة

1- ملون ماسون الثلاثية Masson's trichrome stain

ملون ثلاثي يستعمل في تلوين الانسجة وفق بروتوكول خاص طورها Pierre Masson's 1880-1959 لها تطبيقات مختلفة ، جميعها مناسبة لتحديد الليف الكولاجين في الانسجة المحيطة مثل الجلد ، القلب الخ في المقاطع المثبتة بالفورمالين والمطمورة بشمع البارافين، ويمكن استعمالها أيضا للمقاطع المجمدة ،وتلوين الانسجة حسب تقبلها للملون وكما يلي:

- 1- الكيراتين والليف العضلات باللون الأحمر
- 2- الكولاجين والعظم باللون الأزرق او الأخضر
- 3- الساييتوبلازم باللون الأحمر الفاتح او الوردي
- 4- والنواة باللون البني الغامق او الأسود

التثبيت Fixation : 10% فورمالين او محلول بوين

التقطيع Sectioning: قوالب البارافين بسمك 5 مايكروميتر

المحاليل والكواشف: Solutions and Reagents

1-محلول بوين Bouin's Solution:

Picric acid (saturated) ----- 75 ml

Formaldehyde (37-40%) ----- 25 ml

Glacial acetic acid ----- 5 ml

تمزج جيدا وهذا المحلول يحسن من نوعية الصبغة الثلاثية

Mix well. This solution will improve Masson Trichrome staining quality.

2-محلول رايت هيماتوكسيلين Weigert's Iron Hematoxylin Solution:

يتم استعمال الصبغة الثلاثية trichrome عن طريق غمر العينة المثبتة في Weigert's iron hematoxylin ثم في ثلاث محاليل مختلفة هي A، B، C :

Stock Solution A:

Hematoxylin ----- 1 g
95% Alcohol ----- 100 ml

Stock Solution B:

29% Ferric chloride in water ----- 4 ml
Distilled water ----- 95 ml
Hydrochloric acid, concentrated ---- 1ml

Weigert's Iron Hematoxylin Working Solution:

يتم مزج المحلول الأول مع المحلول الثاني وهذا يمكن استعماله خلال ثلاث اشهر فقط

Mix equal parts of stock solution A and B. This working solution is stable for 3 months (no good after 4 months)

Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Solution: -3

Biebrich scarlet, 1% aqueous ----- 90 ml
Acid fuchsin, 1% aqueous -----10 ml
Acetic acid, glacial ----- 1 ml

Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Solution:-4

5% Phosphomolybdic acid ----- 25 ml

5% Phosphotungstic acid ----- 25 ml

Aniline Blue Solution:-5

Aniline blue ----- 2.5 g

Acetic acid, glacial ----- 2 ml

Distilled water ----- 100 ml

1% Acetic Acid Solution: -6

Acetic acid, glacial ----- 1 ml

Distilled water ----- 99 ml

يعد ملون ماسون الثلاثي من الملونات واسعة الاستعمال لدراسة الامراض الخاصة بالعضلات وامراض القلب وتليف الكبد وامراض الكلى مثل تليف الكبدية ويمكن ان يستعمل في تحليل خزع اورام الكبد والكلى وتتم الطريقة كما يلي:

1- هي طريقة محورة بواسطة Kiernan (2008) حيث توضع العينات بعد تحميلها على الشرائح بجارات التلوين وتغمر بثلاث مراحل من الزايلول لمدة 4 دقائق ثم توضع في تركيز تنازلي من الكحول الايثيلي 100%، 96%، 90% ، 80%، 70% لمدة 4 دقائق لكل تركيز .

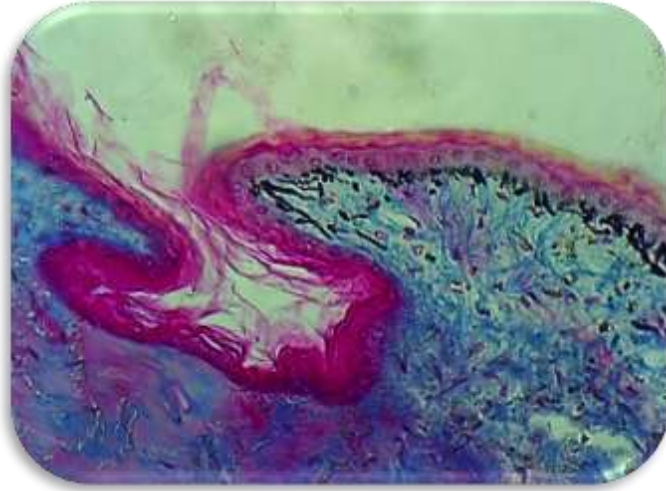
2- تغمر الشرائح بعدها في محلول بوين Bouins solution بدرجة حرارة 60 C لمدة 45 دقيقة. بعدها تغسل في الماء الجاري الا ان يختفي اللون الأصفر الناتج عن محلول بوين من الشرائح

غير ان هذه الخطوة ليست ضرورية اذا لم تكن العينات مثبتة بالفورمالين
3- ولكي يتم تمييز النواة تغمر الشرائح في ملون هيماتوكسيلين رايت المحور modified Weigerts hematoxilin لمدة 8 دقائق وبعدها تغسل بالماء الجاري لمدة دقيقتين .

4- ولغرض تلوين الساييتوبلازم وكريات الدم الحمراء يستعمل الفوكسين الحامضي لمدة 5 دقائق ثم توضع في الماء الجاري مرة أخرى للغسل لمدة دقيقتين .

5- توضع الشرائح في حامض الفوسفومالبديك لمدة 10 دقائق لغرض تثبيت الملون

- 6- ثم توضع الشرائح مباشرة في ملون الميثيل الزرقاء لمدة 5 دقائق لغرض تلوين ارومة الخلايا الليفية والكولاجين .
- 7- تغسل الشريحة في الماء الجاري لمدة دقيقتين
- 8- وأخيرا توضع الشريحة في 1% حامض الخليك الثلجي لدقيقة واحدة
- 9- توضع الشريحة في تركيز تصاعدي من الكحول الايثيلي 70% ، 80% ، 90% ، 95% و 100% لمدة دقيقة واحدة لكل تركيز.
- 10- توضع الشريحة في الزايلول لدقيقة واحدة .
- 11- يتم تحميل غطاء الشريحة باستعمال DPX
- 12- يتم فحص العينات باستخدام المجهر الضوئي



صورة (1-7) لجلد حيوان زاحف ملون بالملون الثلاثي لماسون Trichrome masson stain

المصادر

- Kiernan J.A.2008. Histological and histochemical method (theory and practice) fourth edition. United Kingdom.Scion Publishing.
- Bancroft J.D and Stevens A. 1982.Theory and practice histological techniques ، 2nd ed . Churchill living stone ، edinburgh; pp 662.
- Muna S. Rashid . 2015 . Histological and comparative study to the skin between two lizards *Uromastix aegyptius* and *Varanus griseus* Ph. D. Thesis. Collage of science – University of Tikrit.

- منى صلاح رشيد. (2018) انسجة الجهاز الهضمي للخفاش دراسة مقارنة مع بقية اللبائن مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد (18) العدد (2) لسنة 2018 ص 201-214

2- صبغة (PAS (Periodic Acid Schiff

د. رفل فراس جابر

تُستخدم هذه الطريقة للكشف عن الجليكوجين في الأنسجة مثل الكبد والعضلات القلبية والهيكلية في أقسام الأنسجة المثبتة بالفورمالدهايد 10% والمطمورة بالبرافين ومقطعة الى شرائح بسمك 5-10 مايكروميتر ، ويمكن استخدامها للشرائح المجمدة أيضاً. حيث يتم تصبغ الجليكوجين ، الميوسين ، والفطريات باللون الأرجواني وتلون النواة بالازرق.

التخزين:

قم بتخزين محلول Periodic acid ، و كاشف Schiff في الثلاجة (2-8 درجة مئوية). تشكيل الراسب في الكاشف Schiff لا تؤثر على جودة الأداء.

طريقة التحضير:

المحاليل والكواشف:

0.5% محلول Periodic acid:

Periodic Acid ----- 0.5 غرام

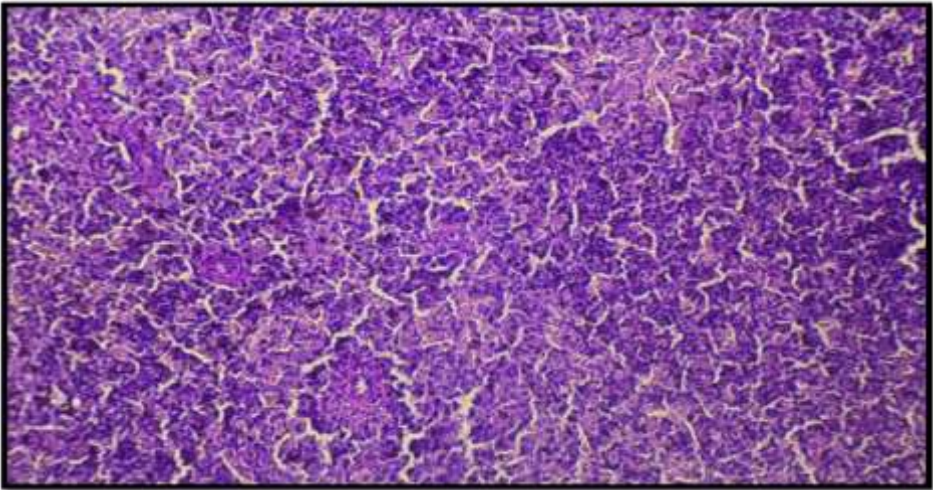
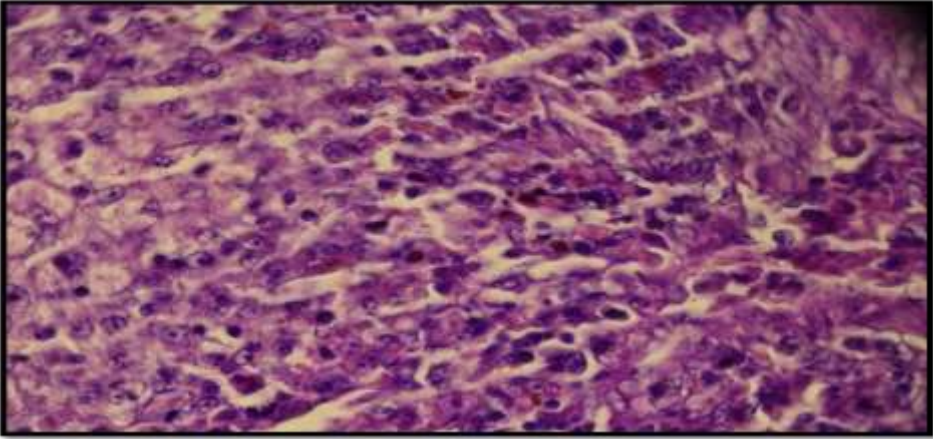
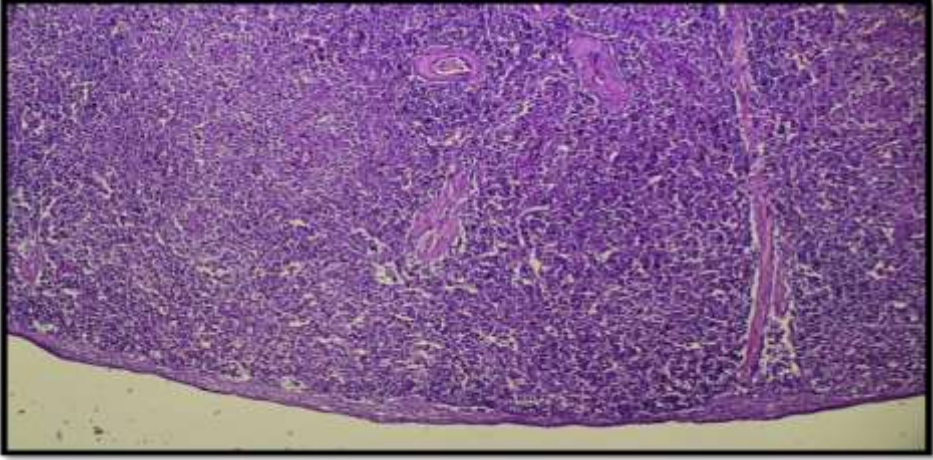
ماء مقطر ----- 100 مل

محلول كاشف Schiff:

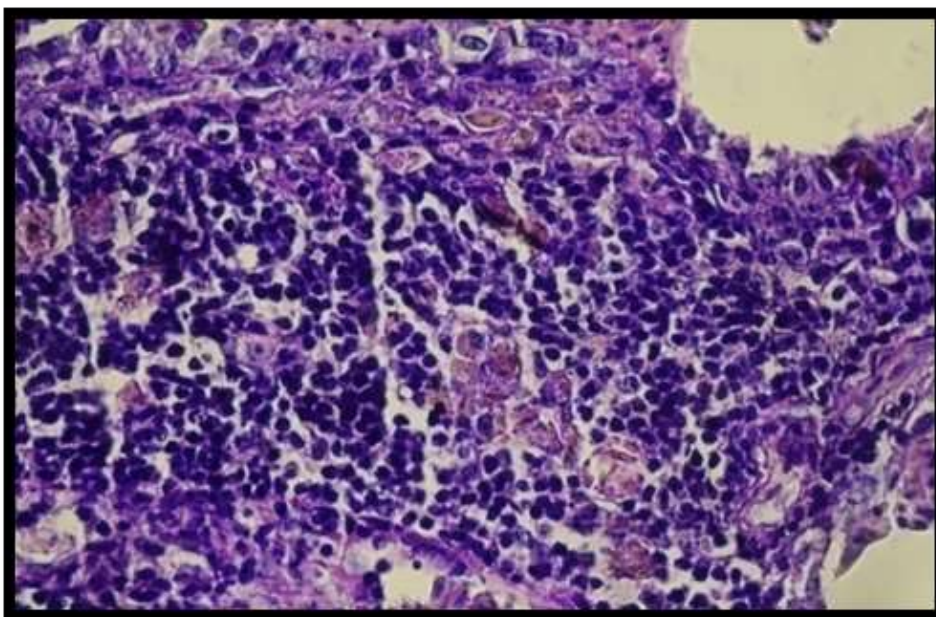
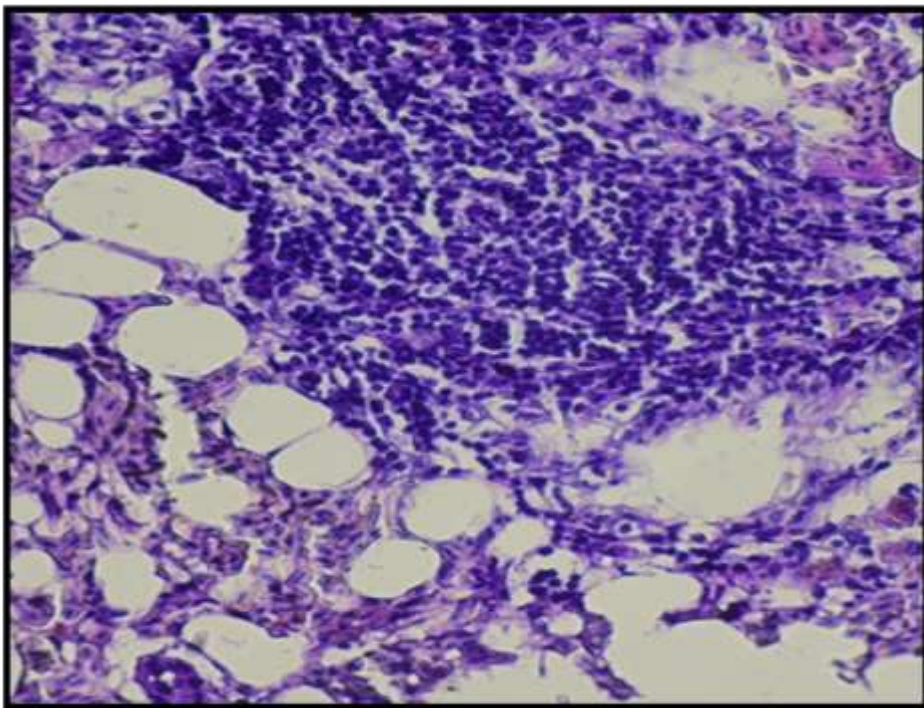
يتم صب 10 مل من الفورمالدهايد 37 % في زجاج الساعة Watch glass. بعدها يضاف اليه بضع قطرات من كاشف Schiff ليتم اختباره. سوف يتحول كاشف Schiff الجيد بسرعة إلى اللون الأحمر الأرجواني. كاشف Schiff الغير جيد سيعطي تفاعل متأخر وسيكون اللون الناتج أزرق داكن أرجواني.

طريقة العمل (للأنسجة) :

- 1- يتم التخلص من شمع البرافين الزائد من القطاعات النسيجية ويتم شطفها بعناية بواسطة عدة تغيرات بماء مؤين Ionized water
- 2- غمر الشرائح في محلول Periodic acid لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة.
- 3- تشطف الشرائح في عدة تغيرات من الماء المقطر.
- 4- تغمر الشرائح في كاشف Schiff لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.
- 5- تغسل الشرائح في ماء الصنبور الجاري لمدة 5 دقائق.
- 6- توضع الشرائح في محلول الصبغة الروتينية Maeyer's Haematoxylin ولمدة 90 ثانية.
- 7- تشطف الشرائح في ماء الصنبور الجاري.
- 8- تجفف ، تروق وتغطي بمحلول التولوين او الزايلين ثم توضع شريحة الغطاء الزجاجي cover slip وتفحص بالمجهر الضوئي الاعتيادي.



الصور 1-8 ادناه مأخوذة بواسطة المجهر الضوئي الاعتيادي لنسيج الطحال بقوة تكبير 4x، 10x ، 40x على التوالي (Rafel، 2018):



الصور (9-1) ادناه مأخوذة بواسطة المجهر الضوئي الاعتيادي للأنسجة اللمفاوية المتبعثرة في الرئة بقوة تكبير 40x (Rafel، 2018):

طريقة العمل (للدم ونخاع العظم):

- 1- تثبت الشرائح الحاوية على عينة الدم المجففة بالهواء لمدة دقيقة واحدة في درجة حرارة الغرفة في محلول الفورمالين إيثانول.
 - 2- تشطف الشرائح في مياه الصنبور الجارية ببطء لمدة دقيقة واحدة.
 - 3- توضع الشرائح في محلول Periodic acid لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة.
 - 4- تشطف الشرائح في عدة تغيرات من الماء المقطر.
 - 5- توضع الشرائح في كاشف Schiff لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.
 - ملاحظة: بعد الاستخدام مباشرة ، قم بتغطية Schiff's Reagent واعدته إلى الثلاجة (2-8 درجة مئوية).
 - 6- تغسل الشرائح في ماء الصنبور الجاري لمدة 5 دقائق.
 - 7- توضع الشرائح في محلول الصبغة الروتينية Maeyer's Haematoxylin ولمدة 90 ثانية
 - 8- تشطف الشرائح في ماء الصنبور الجاري لمدة 15-30 ثانية ، وتجفف بالهواء وتفحص مجهرياً تحت العدسة الزيتية (x100). يمكن وضع وسط تغطية مناسب (التولوين أو الزايلين) على الشرائح.
- المصدر:

Rafel Firas Jaber (2018). Histological and Histochemical Studies for Evaluation of Carbon Accumulation in Lymphatic Tissues of Birds within Polluted Areas . MSc. Thesis. College of science-University of wassit.

Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B.(1987). Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition; Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. Pp: 400, 401.

تحضير الاجنة وطرق دراسة التشوهات الجنينية

التأثيرات التيراتوجينية وتشوهات الهيكل العظمي باستخدام التلوين المزدوج للهيكل العظمي
Mice Embryo Skeleton Double Staining

يتم تشريح الحيوانات و تلوين هيكل الاجنة العظمية بحسب طريقة Erdoğan (Erdoğan et al, 1995) مع اجراء بعض التحويرات:

اولا- التثبيت :Fixation

تنتزع الاجنة من الرحم وتوضع في الايثانول 95 % لمدة 3-4 أيام، ثم تخرج من محلول التثبيت وتنتزع جلودها برفق، ثم تنقلت إلى الاسيتون المطلق لمدة يومين لإذابة الدهون منها و يجب أن تكون نسبة الكحول والأسيتون أكبر من حجم الجنين بعشرة أضعاف.

ثانيا- التلوين Staining:

يحضر 2 لتر من محلول التلوين بمزج المكونات التالية:

-محلول ملون أليزيان المحضر بإذابة 0.3 غم من الصبغة في 100 مل من الايثانول(70%).

-محلول ملون الاليزارين المحضر بإذابة 0.1 غم من الصبغة في 100 مل من الايثانول المطلق.

- تمزج محاليل الملونات معاً ويضاف لها 1700 مل من الايثانول (70%) ليصبح المجموع 1900 مل

- يضاف له 100 مل من حامض الخليك الثلجي Acetic acid glacial ليصبح المجموع 2 لتر.

- توضع الاجنة في محلول التلوين المحضّر لمدة 3 - 5 أيام، ثم تستخرج وتغسل بالماء الجاري لمدة ساعتين.

ثالثا- الترويق Clearing:

توضع الأجنة في محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 1 % لمدة يوم واحد أو أكثر حتى يصبح الهيكل شفاف وواضح، بعدها تنقل الأجنة إلى التراكيز التالية:

20 % كليسيروول / 80 % [هيدروكسيد البوتاسيوم 0.5 %] لمدة يومين.

50 % كليسيروول / 50 % [هيدروكسيد البوتاسيوم 0.5 %] لمدة 3 أيام.

80 % كليسيروول / 20 % [هيدروكسيد البوتاسيوم 0.5 %] لمدة 5 أيام، تحفظ

الأجنة في الكليسيروول المطلق 100% وتقدر التشوهات الهيكلية بالأعتماد على إستمارات قياسية

المصدر

Erdogan، D.; Kadiodla D. and Peker T.(1995). vsulisation of fetal skeletal system by double staining with alizarin red and alcian blue. Gazi Medical J. .6:55-8

		السيرة الذاتية والعلمية د. منى صلاح رشيد دكتوراه، أستاذ مساعد قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت ،صلاح الدين، العراق	
المعلومات الشخصية			
• الاسم		د. منى صلاح رشيد نجم الحمداني	
• المواليد		1979/02/17	
• مكان الولادة		صلاح الدين، العراق	
• الجنس		انثى	
• الجنسية		عراقي	
• الحالة الزوجية		باكر	
• عدد الأطفال		-	
• رقم الهاتف الجوال		09647706647061	
المعلومات الأكاديمية			
• اللقب العلمي		استاذ مساعد	
• القسم العلمي		قسم علوم الحياة، كلية العلوم ، جامعة تكريت	
• التخصص العام		علم الحيوان	
• التخصص الدقيق		علم الانسجة والاجنة	
• البريد الإلكتروني		muna.salah@tu.edu.iq munasalah111@gmail.com	
التحصيل الدراسي			
الشهادة	السنة	التخصص	الجهة المانحة
• دكتوراه	2015	فلسفة في علم الانسجة والاجنة	كلية العلوم- جامعة تكريت - العراق
• ماجستير	2006	علم الانسجة والاجنة	كلية التربية - جامعة تكريت - العراق
• بكالوريوس	2001-2000	علوم الحياة	كلية التربية للبنات - جامعة تكريت - العراق
الألقاب العلمية			
• مدرس مساعد		2006/12/12	
• مدرس		2009/1/14	
• أستاذ مساعد		2017/10/2	
• أستاذ		-----	

الفصل الثاني

الكيمياء النسجية المناعية (IHC) Immunohistochemistry

م.د. سجي حسين دلفي سالم

الكيمياء النسجية المناعية (IHC) هي تقنية بيولوجية واسعة الاستخدام تجمع بين علم المناعة والأنسجة والكيمياء الحياتية، إذ يشير مصطلح الكيمياء النسجية المناعية (IHC) إلى عملية الكشف عن مستضدات Antigen معينة في الأنسجة الحيوية مثل البروتينات وصبغها بأجسام مضادة Antibody معلمة بالاعتماد على مبدأ الفة الارتباط بين الأجسام المضادة والمستضدات الهدف Target وبذلك يتم الكشف عن البروتين المطلوب. أن أول دراسة لـ IHC أجريت في عام 1943 من قبل Coons وزملاؤه حيث استخدم الأجسام المضادة المتفلورة Fluorescein isothiocyanate Antibody لتحديد تركز مستضدات المكورات الرئوية Pneumococcal في الأنسجة المصابة.

تطبيقات تقنية الكيمياء النسجية المناعية (IHC) Immunohistochemistry Application

- 1- الكشف عن السرطان والتمييز بين الورم الخبيث والحميد
Immunohistochemistry in Cancer
- 2- التنبؤ Prognosis بتجدد الخلايا Cell proliferation
analysis، مستقبلات الهرمون Hormone receptors.
- 3- مجال علم الاعصاب Immunohistochemistry
in Neuroscience
- 4- تطبيق العلاج Immunohistochemistry in Therapeutic
applications
- 5- نقل الاشارات Immunohistochemistry in Signal
transduction

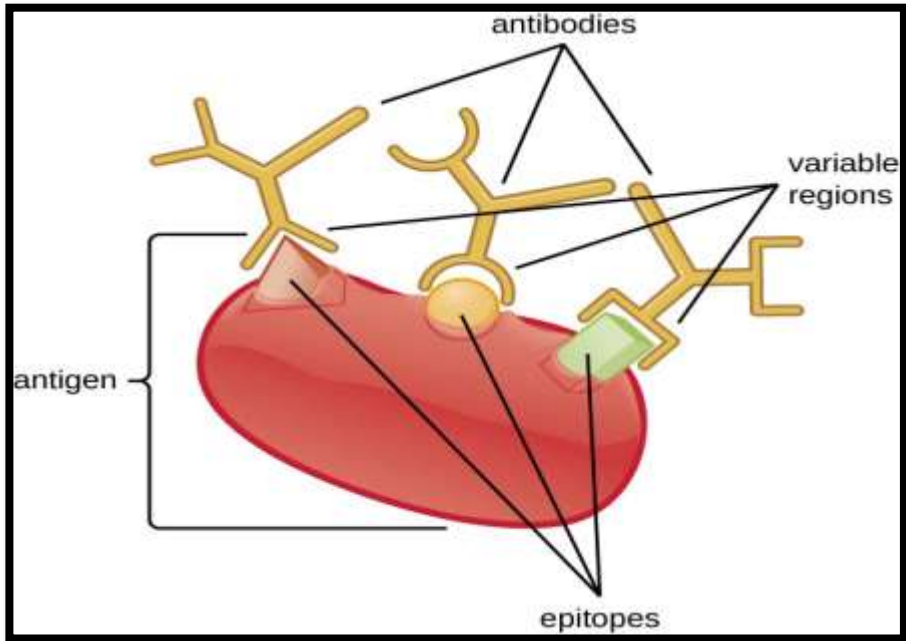
المبدأ الاساسي Basic principle

إن المبدأ الأساسي لتقنية الكيمياء النسجية المناعية (IHC) هو الكشف عن مستضد معين في الخلية من خلال تطبيق الجسم المضاد المطابق له ليكون رد فعل ويؤدي الى تكوين معقد المستضد - جسم مضاد Antigen-Antibody complex، يحتوي المستضد على موقع يسمى Epitope (شكل 1) يستدعي استجابة مناعية خاصة لتطوير الجسم المضاد، إذ يحتوي هذا الموقع على خصائص هندسية وكيميائية مكملية تساعد على الارتباط بالجسم المضاد وهو المسؤول عن تكوين المعقد، هذا المعقد يمكن رؤيته من خلال ربط وسم او مؤشر marker محدد مثل صبغة متألفة fluorescent

dye ، انزيم enzyme ، عنصر مشع radioactive element او ذهب غروي colloidal gold بالجسم المضاد الاولي او الثانوي .

لأستكمال تقنية الكيمياء النسيجية المناعية يجب حصول ما يلي:

- 1- ارتباط الجسم المضاد الاولي مع المستضد الخاص به.
- 2) تكوين معقد الجسم المضاد - المستضد (Ag-Ab) عن طريق الحضانة مع جسم مضاد ثانوي مترافق مع إنزيم .
- 3) مع وجود مادة لونية Chromogen ، يحفز الإنزيم لتوليد رواسب ملونة في مواقع ارتباط الجسم المضاد - المستضد.



شكل (1-2): شكل تخطيطي يوضح مواقع الارتباط epitopes على سطح المستضد Antigen

طرق التصبغ الكيميائي المناعي النسيجي Immunohistochemical Methods

الطريقة الأنزيمية للكيمياء النسيجية المناعية (IHC) تعتمد على استخدام كواشف مثل كلوريد الكالسيوم ، هيدروكسيد الصوديوم ، محاليل حمض الهيدروكلوريك والزايلول لإزالة الشمع والميثانول، إذ تستخدم الكيمياء النسيجية المناعية طرق مختلفة للتصبيغ مثل

الطريقة المباشرة Direct method التي تتم بخطوة واحدة ، الطريقة غير المباشرة Indirect method والتي تتم بخطوتين وغيرها من الطرق.

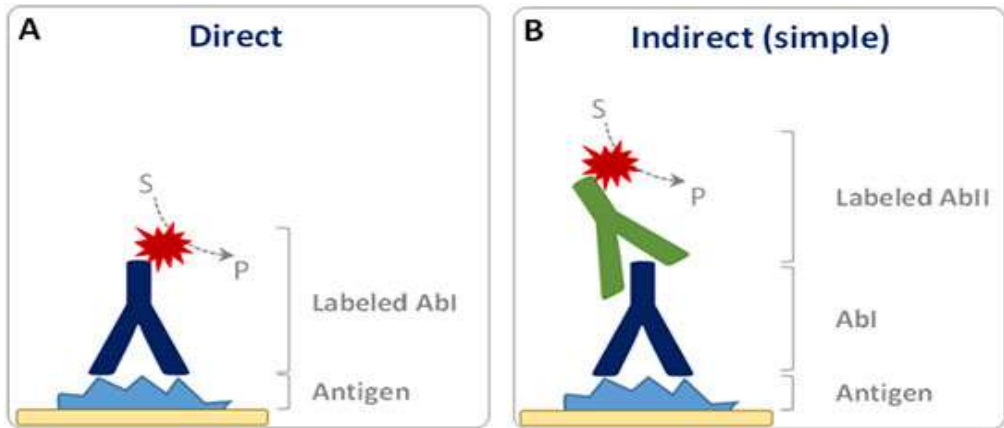
1- الطريقة المباشرة Direct method

الطريقة المباشرة هي طريقة التصبيغ بخطوة واحدة ، وتتضمن استخدام جسم مضاد محدد ومعلم يتفاعل مباشرة مع المستضد في المقطع النسيجي، حيث يستهلك في هذه الطريقة جسماً مضاداً واحداً فقط ويكون الإجراء قصيراً وسريعاً ومع ذلك ، فهي غير حساسة بسبب قلة تضخيم الإشارة ونادراً ما تستخدم منذ اكتشاف الطريقة غير المباشرة (شكل 2-2، A).

2- الطريقة غير المباشرة Indirect Method

تتضمن الطريقة غير المباشرة الأجسام المضادة الأولية غير المعلمة (الطبقة الأولى) التي تتفاعل مع مستضد النسيج ، والجسم المضاد الثانوي المعلم (الطبقة الثانية) الذي يتفاعل مع الأجسام المضادة الأولية، إذ تعتبر هذه الطريقة أكثر حساسية بسبب تضخيم الإشارة من خلال عدة تفاعلات للأجسام المضادة الثانوية مع مواقع مختلفة للمستضد على الجسم المضاد الأولي، بالإضافة إلى ذلك فهو اقتصادي أيضاً حيث يمكن استخدام جسم مضاد من الطبقة الثانية المعلم مع العديد من الأجسام المضادة للطبقة الأولى (مرفوعة من نفس الأنواع الحيوانية) إلى مستضدات مختلفة.

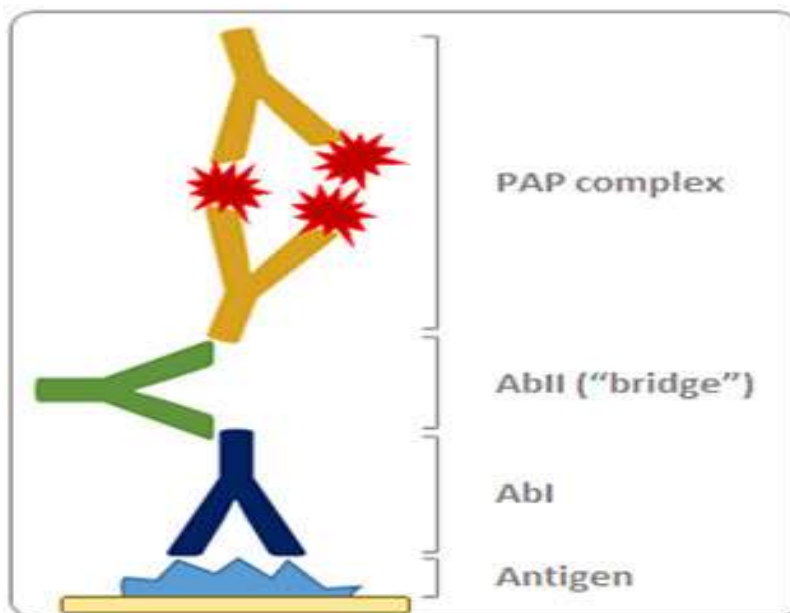
إذ يمكن تعليم الجسم المضاد للطبقة الثانية بصبغة الفلورسنت مثل FITC أو الرودامين rhodamine أو تكساس الأحمر Texas red ، وهذا ما يسمى طريقة التآلق المناعي غير المباشر، أو يمكن تمييز الجسم المضاد للطبقة الثانية بإنزيم مثل البيروكسيداز peroxidase أو الفوسفاتاز القلوي alkaline phosphatase أو أوكسيداز الكلوكونز glucose oxidase ، وهذا ما يسمى بطريقة الإنزيم المناعي غير المباشر (شكل 2-2، B).



شكل (2-2): شكل تخطيطي يوضح الفرق بين الطريقة المباشرة (A) والطريقة غير المباشرة (B)

طريقة PAP (Peroxidase anti-peroxidase method):

طريقة PAP هي تطور إضافي للتقنية غير المباشرة وتتضمن طبقة ثالثة وهي جسم مضاد لانزيم البيروكسيداز مستخلص من الارانب rabbit antibody to peroxidasels، إذ يرتبط هذا الجسم المضاد مع البيروكسيداز peroxidase ليشكل مركب مستقراً للغاية (gaba-globulin and peroxidase)، إذ يعمل هذا المركب كمستضد من الطبقة الثالثة ويصبح مرتبطاً ب anti-rabbit gaba-globulin غير المرتبطة في الطبقة الثانية. الحساسية لهذه التقنية أعلى بحوالي 100 إلى 1000 مرة لأن جزيء البيروكسيداز peroxidase غير المترافق كيميائياً مع مضاد IgG ولكنه مرتبط مناعياً ولا يفقد أي من نشاطه الإنزيمي. كما أنه يسمح بتخفيف أعلى بكثير للجسم المضاد الأولي، وبالتالي القضاء على العديد من الأجسام المضادة غير المرغوب فيها وتقليل التصبغ غير المرغوب فيه (شكل 2-3).



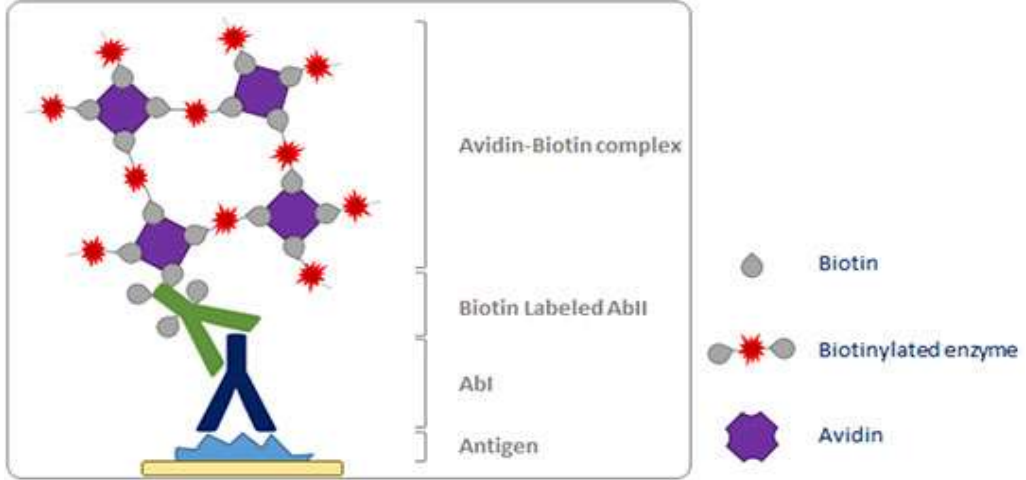
شكل (2-3): شكل تخطيطي يوضح طريقة Peroxidase anti-peroxidase method

طريقة مركب أفيدين - بيويتين (ABC) (ABC) Avidin-Biotin Complex Method:

طريقة ABC هي طريقة IHC القياسية وأحد التقنيات المستخدمة على نطاق واسع للتصبيغ المناعي الكيميائي immunohistochemical staining . الأفيدين Avidin ، وهو بروتين سكري كبير glycoprotein ، إذ يمكن تعليمه بالبيروكسيداز peroxidase أو التآلق fluorescein وله الفة عالية جداً للارتباط بالبيوتين،

البيوتين Biotin وهو فيتامين منخفض الوزن الجزيئي يمكن أن يقترن بمجموعة متنوعة من الجزيئات البيولوجية مثل الأجسام المضادة.

تتضمن التقنية ثلاث طبقات الطبقة الأولى هي الأجسام المضادة الأولية غير المعلمة، أما الطبقة الثانية فهي عبارة عن جسم مضاد ثانوي Biotinylated antibody ، أما الأخيرة هي مركبه من بيروكسيداز أفيدين- بيوتين avidin-biotin peroxidase. البروكسيداز لاحقاً يرتبط مع ال DAB او مركب اخر لينتج صبغة لونية كناتج نهائي كما موضح في شكل (2-4).



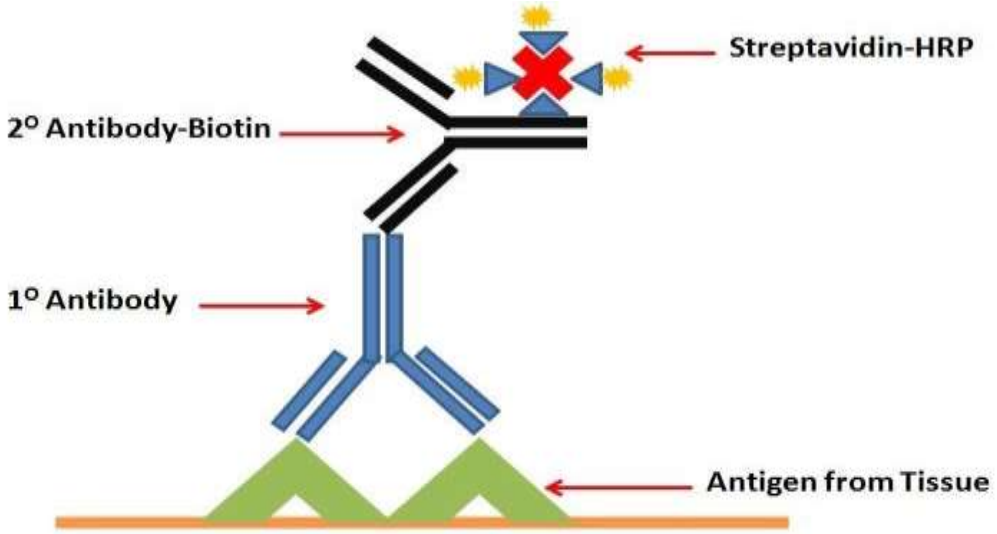
شكل (2-4): شكل تخطيطي يوضح طريقة Avidin-Biotin Complex

طريقة Labeled StreptAvidin Biotin (LSAB)

Streptavidin ، المشتق من البكتريا العقدية Streptococcus ، هو ابتكار حديث لاستبدال ال avidin بجزيئة الستربتافيدين Streptavidin غير المشحونة بالنسبة للأنسجة الحيوانية ، على عكس ال avidin الذي له نقطة تساوي الجهد الكهربائي 10 ، وبالتالي يتم التخلص من الارتباط الإلكتروستاتيكي للأنسجة، بالإضافة إلى ذلك لا يحتوي الستربتافيدين Streptavidin على مجموعات الكربوهيدرات التي قد ترتبط بالكيتين الأنسجة ، مما يؤدي إلى بعض التصيبغ للشريحة.

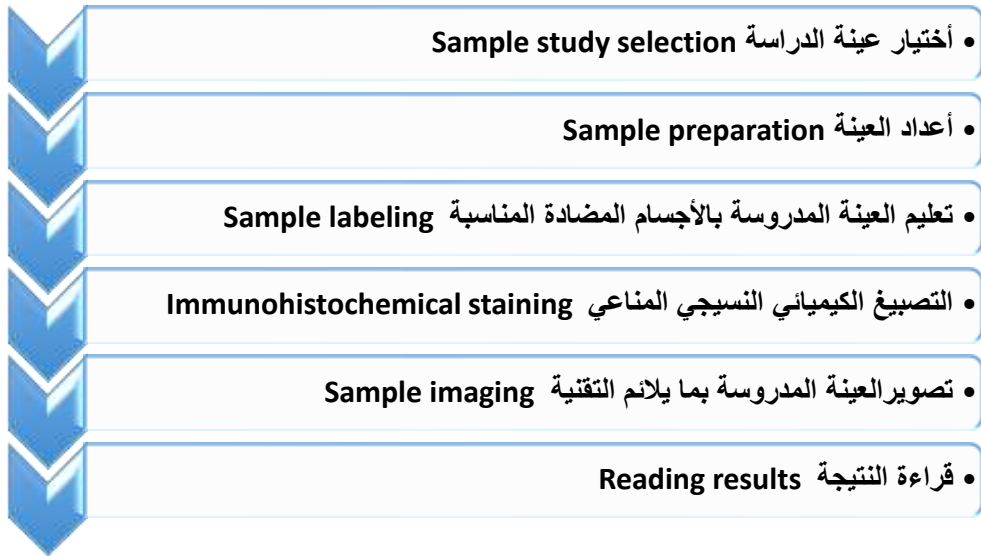
LSAB تقنياً يشبه الطريقة القياسية ABC إذ أن الطبقة الأولى هي الأجسام المضادة الأولية غير المعلمة unlabeled primary antibody ، أما الطبقة الثانية فهي عبارة عن جسم مضاد ثانوي حيوي secondary antibody ، بينما الطبقة الثالثة هي معقد إنزيم - ستربتافيدين Enzyme-Streptavidin conjugates (HRP-) Streptavidin أو AP-Streptavidin لتحل محل مركب avidin-biotin peroxidase. لاحقاً الانزيم يصبح مرئي عند تطبيق محلول ملون مثل الكروموجين chromogen لانتاج صبغة لونية كناتج نهائي . إذ يمكن أن تكون الطبقة الثالثة أيضاً

صبغة متفلورة او متألقة Fluorescent dye-Streptavidin مثل FITC- Streptavidin إذا كان وضع العلامات الفلورية مفضلاً، إذ تشير الدراسات الحديثة إلى أن طريقة LSAB أكثر حساسية بحوالي 5 إلى 10 مرات من طريقة ABC القياسية (شكل 5-2).



شكل (5-2): شكل تخطيطي يوضح طريقة Labeled StreptAvidin Biotin
الخطوات المختبرية لأجراء تقنية الكيمياء النسيجية المناعية
Immunohistochemistry steps

إذ يتم الاعتماد على البروتوكول المجهز ضمن العدة Kit لأجراء الخطوات اللازمة لهذه التقنية لكن هناك خطوات رئيسة يمكن تلخيصها على النحو الاتي (شكل 2-6، شكل 7-2):



شكل (2-6) : مخطط يوضح الخطوات الرئيسية لتقنية التصبغ النسيجي المناعي IHC

- 1- اختيار عينة الدراسة Sample study selection
 - 1-1- الانسجة الامراضية Histopathology
 - 1-1-1 عينات مأخوذة مباشرة من الجسم Fresh sample
 - 2-1-1 عينات مثبتة بالفورمالين ومطمورة بشمع البرافين Formalin fixed paraffin embedded tissue
 - 3-1-1 مقاطع مجمدة Frozen-sections
 - 2-1- عينات خلوية Cytology
 - 1-2-1 مسحات Smears
 - 2-2-1 قوالب خلايا Cell blocks
- 2- أعداد العينة Sample preparation
 - 1- التثبيت Fixation: تثبت عينة النسيج المأخوذة حديثا في محلول الفورمالين 10% لمدة لا تقل عن 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة .
 - 2- الغسل Washing: شطف النسيج بماء الصنبور الجاري لمدة 5 دقائق .
 - 3- سحب الماء (الانكاز) Dehydration : تجفيف النسيج من خلال امراره في سلسلة تصاعدية من تراكيز الكحول الايثيلي (70% - 80% - 95% - 100% - 100%) لمدة ساعتين لكل تركيز.
 - 4- الترويق Clearing : ويتم بوضع النسيج بالزايلول Xylene وبواقع تبديلين، اي يوضع النسيج في قنينة تحتوي على الزايلول لمدة ساعة ثم يوضع في قنينة ثانية

تحتوي على الزايلول ولمدة ساعة اخرى لغرض سحب الكحول الزائد فضلا عن شفافية النموذج.

5- التثريب Infiltration والطر Embedding: يشرب النسيج وذلك بوضعه في شمع البرافين لمدة ساعتين ويطمر بمنصهر شمع البرافين في قوالب الطمر وتترك القوالب لكي تتصلب في درجة حرارة الغرفة ،قوالب الشمع يمكن تخزينها في المختبر لعدة سنوات.

6- التقطيع Sectioning: يتم تقطيع النسيج الى مقاطع نسيجية بسمك 3-4 مايكرومتر باستخدام جهاز التقطيع Microtome ثم تغمر في حمام مائي حاوي على الماء المقطر بدرجة حرارة 40 درجة مئوية ،تنقل المقاطع على شريحة زجاجية موجبة الشحنة Positive charge خاصة بهذه التقنية .

7- Backing of slide : تنقل العينات الى فرن كهربائي ذو درجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة 6 دقيقة.

8- Deparaffinization: لغرض ازالة شمع البرافين توضع العينات بمتغيرين من الزايلول Xylene لمدة 5 دقائق لكل منهما (شكل 2-8).

9- Rehydration : تمرر الشرائح بسلسلة تنازلية من الكحول الايثيلي (100%-95 % -85%) لمدة 5 دقائق لكل تركيز لإعادة ترطيب النسيج (شكل 2-8).

10- تغسل الشرائح النسيجية بالماء المقطر لمدة دقيقة واحدة ، ثم تشطف بالمحلول الملحي المنظم Phosphate buffered saline (PBS) مرتين لمدة 5 دقائق في كل مرة (شكل 2-9).

11- Heat Induced Epitope Antigen retrieval: تنقل الشرائح بعد ذلك الى وعاء يحوي محلول استرجاع Epitope المستضد مثل (Tris/EDTA buffer) والذي تم وضعه مسبقا بالميكرويف او على المسخن الحراري Heater لحين وصوله لدرجة حرارة 93 ولمدة 20 دقيقة (شكل 2-10).

12- تغسل الشرائح بالمحلول الملحي المنظم Phosphate buffered saline (PBS) مرتين لمدة 5 دقائق في كل مرة.

13- تترك الشرائح بعد ذلك لتبرد في هواء الغرفة لمدة تتراوح ما بين 30-40 دقيقة ،يحدد المقطع النسيجي المراد دراسته بقلم التحديد Barrier pen .

14- Blocking (Inactivation) of endogenous peroxidase : تثبيط انزيمات البيروكسيداز الداخلية وتتم بحضن الشرائح النسيجية مع 3% H₂O₂ لمدة 15 دقيقة.

15- تغسل الشرائح بالمحلول الملحي المنظم Phosphate buffered saline (PBS) مرتين لمدة 5 دقائق في كل مرة.

16- Blocking: الغلق او الحجب لل Epitope الغير مرغوبة ويتم بحضن الشرائح النسيجية مع Blocking reagent مثل Serum Blocking Reagent G ،Avidin Blocking Reagent ،Biotin Blocking Reagent and لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة وفي ظروف رطوبة Humidity chamber.

تعليم العينة المدروسة بالأجسام المضادة المناسبة Sample labeling

- 17- Incubation with primary antibody : تغسل الشرائح بالمحلول الملحي المنظم PBS لمدة 5 دقائق ،تضاف (100مايكروليتر) من الاجسام المضادة الاولية المخففة Primary antibody (مخففة في 5 % مصل الابقار والمحلول الملحي المنظم Bovine serum +PBS وتحضن في الظلام في الثلجة في درجة 4 درجة مئوية لمدة ليلة كاملة .
- 18- Rewarming : تدفئة الشرائح بعد استخراجها من الثلجة تترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15-30 دقيقة .
- 19- تغسل الشرائح بالمحلول الملحي المنظم Phosphate buffered saline (PBS) مرتين لمدة 5 دقائق في كل مرة.
- 20- Incubation with secondary antibody : تحضن الشرائح مع الاجسام المضادة الثانوية المخففة secondary antibody (HRP) وتحضن في غرفة رطبة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 - 60دقيقة.
- 21- تغسل الشرائح بالمحلول الملحي المنظم Phosphate buffered saline (PBS) مرتين لمدة 5 دقائق في كل مرة.

التصبغ الكيميائي النسيجي المناعي Immunohistochemical staining

- 22- يضاف مولد اللون 3 Chromogen ، 3 Di Amino Benzidine DAB الى المقاطع وتحضن لمدة تتراوح ما بين 3-20 دقيقة لحين الحصول على اللون المطلوب للكشف عن الاجسام المضادة بتلوينها (صبغة ال DAB مسرطنة لذلك يجب ارتداء القفازات عند التعامل معها).
- 23- تغسل الشرائح بالمحلول الملحي المنظم Phosphate buffered saline (PBS) مرتين لمدة 5 دقائق في كل مرة.
- 24- للتأكد من ظهور اللون تفحص الشرائح النسيجية بالمجهر الضوئي ،ثم يكرر الشطف بالمحلول الملحي المنظم ثلاث مرات بمعدل 10 دقائق لكل مرة ثم تشطف الشرائح بالماء المقطر Distilled water ويزال الفائض منه .
- 25- بعد ذلك تصبغ الشرائح النسيجية بالمابر هيماتوكسولين s Haematoxylin'Mayer لمدة تتراوح ما بين 3-5 دقائق ثم تشطف بماء الصنبور الجاري لمدة 10 دقائق وتمرر بسلسلة تصاعدية من الكحول الايثيلي (50%- 70%- 95 % - 100%) لمدة 5 دقائق لكل تركيز ثم تمرر بمتغيرين من الزايلين Xylene بمعدل 5 دقائق لكل متغير.
- 26- تترك الشرائح في هواء الغرفة مدة 20 دقيقة لتجف وتغطي بواسطة ال D.P.X وغطاء الشريحة cover slip ثم تفحص تحت المجهر

لتحديد المستضد المطلوب والذي يظهر بشكل تصبغ بني Brown pigmentation في غشاء الخلية أو السيتوبلازم أو النواة.

تصوير العينة المدروسة بما يلائم التقنية Sample imaging

27- يتم فحص المقاطع النسيجية باستخدام المجهر الضوئي على قوى تكبير (10x، 40x، 100x) والنقاط الصور باستخدام كاميرا رقمية Digital camera.

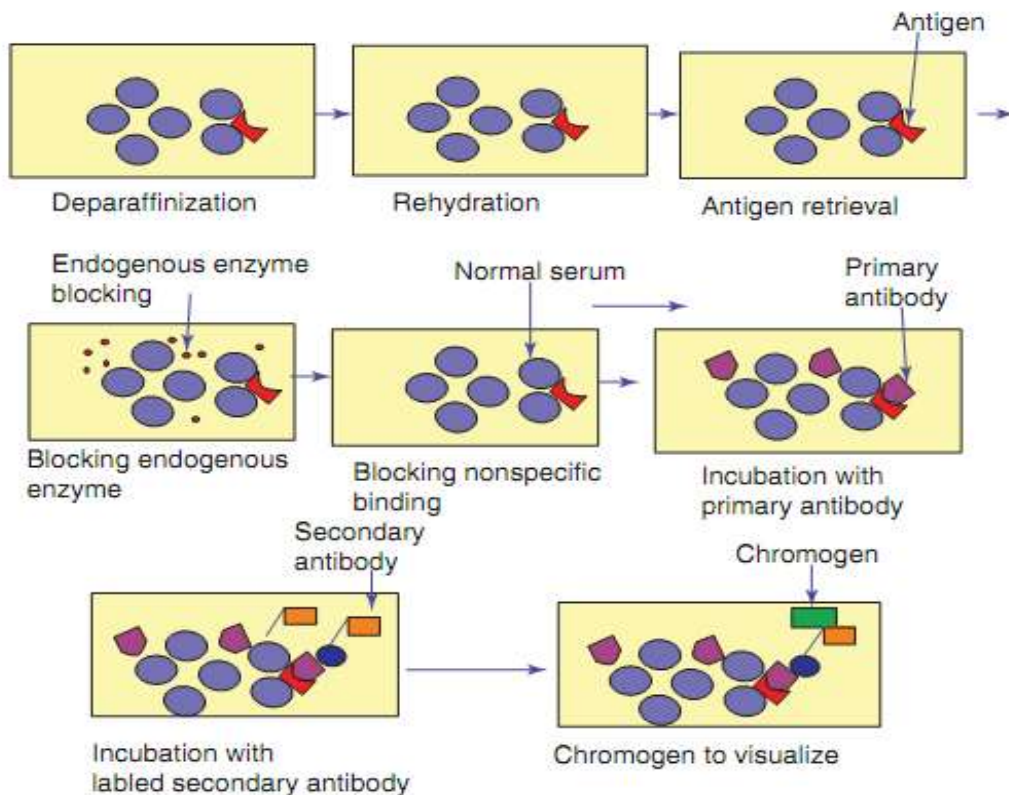
قراءة النتيجة Reading results

28- نسبة المنطقة area percent (AP) أو النسبة المئوية للمنطقة البنية brown label (المؤشر لعدد الخلايا) ومتوسط الشدة mean intensity (MI) (مؤشر لمستوى التعبير) يتم تحليلها وقياسها بواسطة برنامج ImageJ 1.46r software . التحليل يتم عن طريق أخذ 3 لقطات مقطعية عشوائية من مناطق مختلفة في كثافة التصبغ ، ثم تحمل في برنامج ImageJ. ال AP التي تم الحصول عليها تم حسابها وفق طريقة معادلة H-Score لحساب مستوى شدة التعبير expression intensity level كما موضح:

$$\text{H-score} = (\% \text{ cell}) \times 3 + (\% \text{ cell}) \times 2 + (\% \text{ cell}) \times 1 = \text{Scores}$$

أو يتم حساب ال score بالاعتماد على المعادلة المرفقة مع ال Kit الخاص بالبروتين المراد الكشف عنه أو الدراسات السابقة ، ويتم التعبير عنه :

+++	High expression	تعبير عالي للجسم المضاد
++	Medium expression	تعبير متوسط للجسم المضاد
+	Low expression	تعبير منخفض للجسم المضاد
—	Non expression	لا يوجد تعبير للجسم المضاد



شكل (7-2): رسم تخطيطي يوضح الخطوات الأساسية للتصبغ النسيجي المناعي
Imunohistochemistry



الصورة (8-2): مراحل اعداد العينة المأخوذة من قوالب الشمع



الصورة (2-9): Antigen retrieval الصورة (2-10): Humidity chamber

يتم تحضير المحاليل المستخدمة في التقنية كالآتي :

1. تحضير محلول الغسل (المحلول الملحي المنظم PBS): حل 1 قرص في 100 مل ماء مقطر يخلط جيدا لحين الاذابة.

2. تحضير 3% H_2O_2 : تتم بإضافة 30 ميكرو لتر من H_2O_2 إلى 970 ميكرو لتر من الماء المقطر لتحضير 1 مل من 3% H_2O_2 .

3. تحضير محلول استرجاع المستضد Antigen retrival : (Tris / EDTA)
 pH = 9 يتم تحضير هذا المحلول من (1.21 غم Tris ، 0.37 غم من EDTA ، 1000 مل من الماء المقطر) وضبط الـ pH الهيدروجيني إلى 9 باستخدام NaOH وبعد ذلك يضاف 0.5 مل من Tween 20 مع المزج .

4. تحضير الاجسام المضادة الأولية primary antibody :تم تحضير محلول الأجسام المضادة الأولية بإضافة عشرة ميكرو لتر من الجسم المضاد الأساسي إلى 1 مل من (1%) ألبومين المصل البقري (BSA) المخفف إلى 100 مل من المحلول الملحي المنظم PBS، تم تحضير هذا المحلول في أنابيب إيبندورف معقمة تستخدم مباشرة أو يتم حفظها في التجميد لحين الاستخدام.

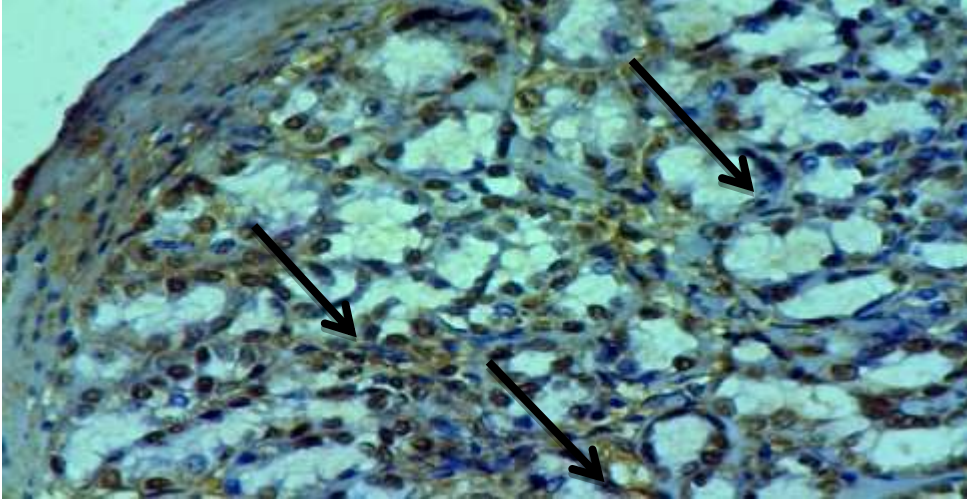
5. تحضير DAB: يحضر انيا قبل استخدامه بإضافة قطرة واحدة (50 ميكرو لتر) من DAB المركز في 1 مل من محلول تخفيف الـ DAB ، يمزج جيدا ويحفظ في الظلام

6- تحضير تراكيز الكحول الايثيلي Ethanol:

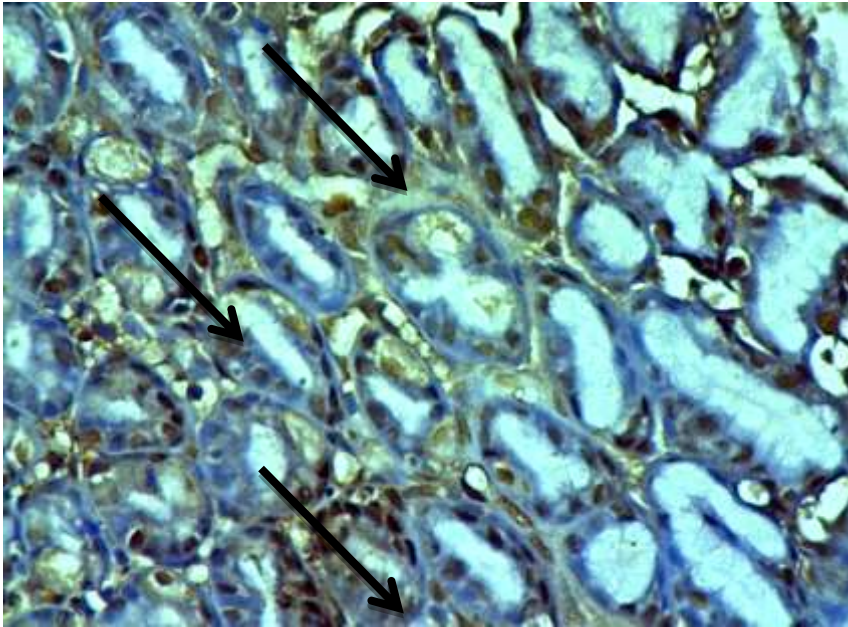
أ. 200 مل من الإيثانول 100%.

ب. 200 مل من 95% إيثانول (95 مل إيثانول + 5 مل ماء مقطر)

- ج. 200 مل من 85% إيثانول (85 مل إيثانول + 15 مل ماء مقطر)
 ت. 200 مل من 70% إيثانول (70 مل إيثانول + 30 مل ماء مقطر)
 ث. 200 مل من 50% إيثانول (50 مل إيثانول + 50 مل ماء مقطر)



الصورة (2-11):التصبغ المناعي النسيجي لمستقبلات عامل نمو البشرة (EGFR)Epidermal growth factor receptor لنسيج مأخوذ من اثني عشر جرد مصاب بالقرحة الهضمية يوضح شدة التعبير تحت تأثير العلاج (X400)



الصورة (2-12):التصبغ المناعي النسيجي لعامل نمو بطانة الاوعية (VEGF)endothelial growth factor لنسيج مأخوذ من معدة جرد مصاب بالقرحة الهضمية يوضح شدة التعبير تحت تأثير العلاج (X400)

Reference المصادر

- Alkarim, S & Alrefai, G. (2015). Immunohistochemistry Technique (in Arabic). 10.13140/RG.2.1.3063.6243.
- Almuoswi, H. J. N. (2018). Healing role of Ipomoea batatas (sweet potato) extract in aspirin induced gastrointestinal ulcer in male albino rats; A histological and Immunohistochemical study. (PhD Thesis. University of Al-Qadisiyah .Iraq).
- Dey, P. (2018). Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer.
- Dilyf, S.H.(2020). Immunological, Biochemical and Histological Study of The Effect for *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* on Induced Gastrointestinal Ulcer in Male Rats. (PhD Thesis. Wasit University .Iraq).
- Falodah, F. A., & Al-Karim, S. (2016). Immuno-and gene expression analysis of EGFR and Nestin during mice skin development. *Tissue and Cell*, 48(3), 274-281.
- <http://www.immunohistochemistry.us>
- Iskandar, A. I. (2016). Stem Cell Markers Expression In Developing Mouse Cardiac Septa: Histological, And Immunohistological Study (PhD Thesis. King Abdulaziz University Jeddah. Saudia arabia).
- Ramos-Vara, J. A. (2017). Principles and methods of immunohistochemistry. In *Drug Safety Evaluation* (pp. 115-128). Humana Press, New York, NY.
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (Eds.). (2018). Bancroft's theory and practice of histological techniques E-Book. Elsevier Health Sciences.

	السيرة الذاتية والعلمية م.د. سجي حسين دلفي سالم الزركاني		
المعلومات الشخصية			
الاسم الكامل		سجي حسين دلفي سالم الزركاني	
المواليد		1988/5/25	
مكان الولادة		واسط / العراق	
الجنس		انثى	
الجنسية		عراقية	
الحالة الزوجية		باكر	
التحصيل الدراسي		دكتوراه علوم حياة	
المعلومات الأكاديمية			
اللقب العلمي		مدرس دكتور	
القسم العلمي		علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة واسط	
التخصص العام		علوم حياة	
التخصص الدقيق		علم الحيوان / أنسجة	
البريد الإلكتروني		Sajabio2019@gmail.com gl1107@uowasit.edu.iq	
الهاتف		07805096494	
Researchgate		https://www.researchgate.net/profile/Saja_Dilfy	
Google scholar		رابط صفحة ال profile من ال Google Scholar https://scholar.google.com/citations?user=4rqE_dYA-AAJ&hl=ar&oi=aoSGLTP-vCapZ1mgYg7d51Elz9Q25gTicBfQawjHHYaiOeraes2t8WgFCvYg&sciund=5319889276694123	
التحصيل الدراسي			
الشهادة	السنة	التخصص	الجهة المانحة
دكتوراه	2020	فلسفة علوم حياة/ علم الانسجة	كلية العلوم - جامعة واسط - العراق
ماجستير	2014	علوم حياة / علم الحيوان	كلية العلوم - جامعة واسط - العراق
بكالوريوس	2010	علوم حياة	كلية العلوم - جامعة واسط - العراق
الألقاب العلمية			
مدرس مساعد		2017	
مدرس دكتور		2020	

الفصل الثالث

علم وظائف الاعضاء physiology

د. هيثم لطيف عبد الهادي صكر الكبيسي و د.بنان راكان عبد العزيز دبدوب

Ⓜ انواع العينات التي تؤخذ من المرضى Types Of Samples Taken From The Disease

هناك العدد من أشكال العينات التي تؤخذ من المريض و ترسل الى المختبر وتختلف هذه العينات على حسب التشخيص المراد الكشف عنه و عن الحالة المرضية للمريض من هذه العينات :

(1) الدم Blood :

يتم سحب الدم من الغالب من الوريد Venous وغالباً ما يؤخذ من منطقة Median Cubital Vein أو من الوريد الفخذي Femoral vein أو سطح الكف Palm surface أو القدم Foot أو فروة الرأس Scalp عن الأطفال.

❖ انواع الفحوصات:

(a) الدم الكامل Whole Blood :

وهو الدم المأخوذ على مائع لتجلط و ذلك من أجل جميع التحاليل الدموية مثل CBC وقياس الهيموجلوبين .

(b) المصل Serum :

بعد عملية فصل الدم، السائل الطافي الأصفر اللون هو المصل Serum ولكن لا تؤخذ العينة على مائع لتجلط، وتجري عليه التحاليل السيرولوجية والتحليلات الكيميائية .

(c) البلازما Plasma :

بعد عملية الفصل والسائل الطافي هو البلازما Plasma، وتختلف عن المصل بان عينة الدم تؤخذ على مائع لتجلط ويستخدم غالباً في قياس عوامل التجلط مثل PT و PTT .

(2) البول Urine :

يفضل اخذ عينة البول في الصباح الباكر مع الاخذ بنظر الاعتبار عند التجميع العينة ان تكون في منتصف البول في وعاء خاص Container مع الاهتمام بنظافة الأعضاء التناسلية قبل التبول وخاصة عند النساء ، تجرى للبول عدة اختبارات منها فيزيائية وكيميائية وميكروسكوبية في قسم Parasitology وايضا يجري لعينة البول فحص بول 24 ساعة في قسم كيمياء الدم و زراعة البول في قسم Microbiology .

(3) البراز Stool :

يجب وضع عينة البراز في وعاء خاص ونظيف حيث تؤخذ العينة إلى قسم Parasitology وذلك لعمل الفحوص المتعددة عليه من أهمها الفيزيائية و الطفيليات و أيضاً يعمل للبراز زراعة جرثومية في قسم Microbiology .

(4) السائل المنوي Seminal Fluid :

للحصول على السائل المنوي لابد ان تكون في المختبر وذلك بوضعها في وعاء نظيف معقم مع التاكيد على امتناع المريض للمعاشرة الجنسية خلال ثلاث أيام بعدها تؤخذ العينة مباشرة وعلى وجه السرعة إلى قسم المخصص لعمل تحليل السائل المنوي وذلك من أجل عد الحيوانات المنوية و تقدير حركتها ولون السائل والحجم و غيرها و قد يتم زراعة لعينة السائل المنوي للكشف البكتيري في قسم Microbiology .

(5) عينات أخرى Other Sample :

هناك عينات أخرى تؤخذ لاجراء تحاليل مثل عينات السائل الدماغي الشوكي CSF وكذلك عينات البلغم Sputum وعينات المسحات لأعضاء الجسم المختلفة مثل مسحة الحلق والجروح والمهبل وغيرها من المسحات كذلك العينات التشريحية Biopsy للكشف عن الأورام.

❖ أنواع أنابيب الدم Types of the blood tubes

لاجراء التحاليل الطبية يتم استخدام أنواع من أنابيب الدم Types of blood tubes تختلف بمحتوى المواد الموجودة بداخلها حسب التحليل المطلوب والأنواع الأشهر هي :

(1) الأنبوب الأحمر Red Tube :

أنبوب جاف تماماً لا يحتوي على أي موانع تجلط وذلك من أجل الحصول على السيرم Serum ، يستخدم في الغالب في تحاليل كيمياء الدم والمصل والهرمونات وبعض التحاليل الأخرى ، من الجدير بالذكر يوجد أنبوب أصفر yellow tube لا يحتوي على أي موانع تجلط ولكن نجد بداخله مادة جل وهي تساعد في فصل السيرم Serum عن كريات الدم Blood Cells ، يفضل عدم فصل العينة إلا بعد تجلد الدم داخل الأنبوب وذلك من أجل عدم تكون جلطة داخل الأنبوب عند الفصل.



(2) الأنبوب الأخضر Green Tube :

يحتوي هذا الأنبوب على مادة مانعة لتجلط وهي Lithium Heparin (LH) ، تستخدم بتركيز قليل من أجل منع التجلط ولا تؤثر على التفاعلات الكيميائية.



(3) الأنبوب البنفسجي Lavender Tube



:
يحتوي على مادة مانعة لتجلط تسمى Ethylene Diamine Tetra acetate (EDTA) تختصر بإسم (EDTA) من نوع EDTA K2 أو EDTA K3 ، يستخدم في تحليل دم مختلفة مثل صورة الدم CBC و تحليل فصائل الدم Blood Group وغيرها.

(4) الأنبوب الأزرق Blue Tube :



يحتوي على مادة سترات الصوديوم Sodium Citrate من أجل الحصول على البلازما وذلك لقياس عوامل تجلط الدم Coagulation Factors ومن أهمها و الشائع في المستشفيات Prothrombin (PT) وكذلك Activated Partial Thromboplastin (aPTT).

(5) الأنبوب الأصفر Yellow Tube :



يحتوي على مادة فاصلة للمصل تشبه الهلام (جل) تسمى Tubes Serum Separator (SST) ، يستعمل بكثرة في قسم المصليات .



(6) الأنبوب الرمادي Grey Tube :

يحتوي على مادة Fluoride Oxalate أو Potassium Oxalate و Sodium Fluoride وذلك لقياس نسبة سكر الكلوكوز في الدم حيث تعمل هذه المادة على يمنع تحلل الكلوكوز ، تؤثر هذه المواد على خلايا الدم لذلك لا يستخدم هذا الأنبوب في تحاليل الدم .



(7) الأنبوب الأسود Black Tube :

يحتوي على مادة Buffer Sodium Citrate حيث يستخدم في تحليل ESR وفي اجراء صورة الدم .

هناك أشكال للأنابيب وللأغطية مختلفة حسب الشركة المصنعة وطريقة فتحها ومقاسات كما يوجد أنبوب صغير يستخدم يحتوي على نفس مادة EDTA للأطفال حديثي الولادة.

❖ أماكن سحب الدم الشرياني والوريدي والشعيري Places of venous and capillary blood drawn, arterial

(1) سحب الدم الشعيري Blood Capillary Extraction :

سحب الدم الشعيري يتم عن طريق احداث ثقب في رأس الأصبع (البنان) أو شحمة الأذن في البالغين اما الأطفال الرضع فيتم عن طريق ثقب أخمص القدم أو إصبع القدم الكبير أو باطن القدم بواسطة مشرط رمحي Puncture او واخزه Lancets

تنظف منطقة السحب وذلك بمسحها بقطعة قطن مبللة بكحول إيثيلي أو كحول أيزوبروبانول 70% ، ثم يوخز الإبهام بواسطة المشرط الرمحي بسرعة وخفة ليحدث جرح بعمق 1-2 مم ويثنى الإبهام فيندفع الدم بغزارة وإذا لم يخرج الدم يرفع الرباط

الضاغط وتهز اليد إلى الأسفل والأعلى عدة مرات . ثم يعاد ربط الرباط الضاغط من جديد ويثن الإبهام فيندفع الدم ، بعد ذلك نضع الماصة الشعرية أفقياً على قطرة الدم الخارجة من الجرح ويترك الدم يندفع في الماصة حتى العلامة المطلوبة وتجمع قطرات الدم في أنبوبة اختبار سعتها 15 مم تحتوى على سائل معتدل التوتر Isotonic من كبريتات الصوديوم مع غسل الماصة عدة مرات بالمحلول نفسه ثم تنتقل لجهاز الطرد المركزي لفصلها وتستخدم أجهزة طرد مركزي من النوع الأفقي لمنع تكسر الأنابيب الشعرية .

(2) سحب الدم الوريدي Blood Venipuncture Extraction :

الدم الوريدي يسحب عادة من الأوردة الموجودة في الذراع أو المرفق بواسطة الإبرة المخصصة لسحب الدم ، يفضل أن يكون الذراع دافئاً والشخص في وضعية مريحة ويطبق الرباط الضاغط حول العضد برفق وتكون ما بين الكتف والمرفق ، على أن يكون الضغط رقيقاً ومن ثم ينظف الجلد في المكان المراد وخزه بقطنه مبللة بكحول طبي ويترك ليجف قليلاً ، بعد ذلك تفرغ الإبرة من الهواء بسحب المدك ودفعه مرارا بحيث يطرد كل الهواء الموجود داخل الإبرة ، بعد ذلك يمسك المرفق باليد اليسرى ويوضع إبهامها على الوريد الذي سيوخز بعيداً عن مكان الوخز 2 سم ومن ثم تمسك الإبرة باليد بين الإبهام والأصابع الثلاثة ومن ثم تدخل الإبرة في الوريد بوخزه واحدة على أن تكون نهاية الإبرة المشطوفة إلى الأعلى فيندفع الدم إلى الإبرة نتيجة سحب مدك الإبرة وعندما يسحب من 5 – 10 مل من الدم وهو المقدار المطلوب عادة يرفع الرباط الضاغط وتوضع قطعة من القطن المعقم بالكحول على مكان الوخز ثم تسحب الإبرة من الوريد بلطف ، ومن ثم يوضع الدم المسحوب في أنبوبة الاختبار تهئية لفصله .

(3) سحب الدم الشرياني Blood Arterial Puncture Extraction :

دم شريان من النادر ما يطلب سحبه إلا في حالات خاصة مثل فحص غازات الدم أو دراسة الاختلاف بين مستوى الكلوكوز في الدم الشريان والدم الوريدي. وكما هو معلوم فإن الدم الشريان شبيه بالدم الشعري.

❖ تأثير مكان تجمع الدم على مكوناته Place the effect of blood collection on its components

العينة عند سحبها من مواقع مختلفة فإن مكونات الدم كذلك تختلف ، ففي عملية ثقب الجلد Skin Puncture يشبه الدم الشرياني الدم الشعيري أكثر من الدم الوريدي ولهذا فإنه من الناحية المخبرية لا يوجد اختلافات واضحة بين الدم الشعيري والدم الشريان في كل من قيمة الأس الهيدروجيني pH والضغط الجزئي للأكسجين PO₂ والضغط الجزئي لثاني أكسيد الكربون PCO₂ وتشبع الأكسجين ، بينما الضغط الجزئي لثاني أكسيد الكربون في الأوردة يكون أعلى اذ يكون من 6 - 7 مل زئبق ، يقل كلوكوز الدم في الأوردة بحوالي 7 ملغم/ 100 مل (0.39 ملليمول/لتر) من مستوى الكلوكوز في الدم الشعيري نتيجة لاستهلاك الأنسجة له .

❖ تحليل الدم Hemolysis :

تكسر كريات الدم الحمراء بواسطة تحليل الدم تحدث داخل الجسم الحي *Invivo* وكذلك في أنابيب الاختبار *Invitro* وهذه العملية يمكن أن تتم تحت ظروف وحالات عديدة منها :

(1) التناضح Osmotically :

غشاء الكرية الحمراء يسمح بنفاذ الماء ، لذلك فإن حجم الخلية يتغير تبعاً لتغير الوسط التناضحي فإذا وضعت الكريات في محلول منخفض التوتر Hypotonic فإن الماء ينفذ إلى داخل الخلية وتفتتح الخلية وتتغير صفات الغشاء وتنشأ به قنوات دقيقة تسمح بمرور الهيموجلوبين وغيره من محتويات الخلية وتنتشر في السائل المحيط بالخلايا .

(2) تحليل الدم المرضي يحصل في الحالات التالية :

(a) الأنيميا أو فقر الدم الحاد Hemolytic Anemia وكذلك في حالة اليرقان عند الأطفال حديثي الولادة Jaundice.

(b) زيادة الهيموجلوبين المفاجيء في البول Paroxysmal Hemoglobinuria.

(3) تحليل الدم الناتج عن تناول بعض العقاقير :

بعض العقاقير تسبب تحليل كريات الدم الحمراء ومنها الكينين Quinine والفيناسيتين Phenacetin والنيتريت Nitrites والكلورات Chlorates .

(4) المذيبات الدهنية :

مثل الكحول ، الإيثر ، الكلوروفورم وبعض المواد مثل الصابون وأملاح الصفراء ومادة السابونين Saponin وهذه المواد تذيب الدهون في غشاء الكرية الحمراء أو تغير اتجاهات ترتيب جزيئات الدهون في الغشاء الخلوي.

(5) الطرق الميكانيكية :

تلعب الطرق الميكانيكية دوراً هاماً بالتأثير السلبي على العينات المختلفة خاصة عينات الدم ومن هذه الطرق الطحن Grinding ، التحريك Stirring أو الرج الشديد Shaking وكذلك تكرار التجميد والتسييح Thawing .

كما أن هناك بعض العوامل الأخرى التي تؤدي إلى تحليل الدم في الأنابيب مثل التغير في درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والتعرض للأشعة فوق البنفسجية .

❖ حفظ الدم : Save blood

يفضل دائماً إجراء التحاليل بالسرعة الممكنة اما لو أراد حفظها فانها تحفظ بعد فصل السيرم أو البلازما مبردة (درجة الانجماد) لغرض تأخير التفاعلات الكيميائية وبالتالي الحيولة دون تغيير نسب المكونات .

درجة الحرارة المناسبة للحفظ هي من 2 - 4 م ، اذ تحدث تغيرات قليلة في هذه الدرجة خلال عدة ساعات من تركها في الثلاجة ، وتحفظ عينات الدم لتحليل السكر والبيروفيت بعد إضافة مادة حافظة اليها.

عند تخزين العينات لمدة طويلة لقياس الانزيمات مثلاً ، فإنه يجب تجميدها بدرجة حرارة (-20 م) بعد فصل السيرم بأسرع وقت ممكن كما يفضل أن تقسم العينات إلى

حجوم صغيرة قبل تجميدها تجنباً لتكرار عملية الإذابة والتجميد مرة ثانية مما يؤدي إلى تغيير أساسي في تركيب البروتينات والإنزيمات ، عند إجراء التحليل تترك العينة لتذوب ببطيء بدرجة حرارة الغرفة او حضانها بباطن الكف ثم تمزج بهدوء لكي نحصل على عينة متجانسة .

✚ لجمع عينات الدم يفضل الاخذ بنظر الاعتبار ما يأتي:

- (1) يفضل جمع عينات الدم من المرضى في الصباح الباكر وقبل الإفطار إلا في حالات خاصة .
- (2) فحص الأنبوب الذي سيوضع فيه الدم ويجب أن يكون جاف حيث أن وجود الرطوبة يؤدي إلى تكسر خلايا الدم والتأكد من كون صلاحية الأنبوب غير منتهية.
- (3) يجب الإشارة إلى نوع العلاج الذي يتناوله المريض.
- (4) يجب تجنب استعمال الضغط السالب عند سحب الدم بل يترك الدم ينساب من الوريد إلى المحقنة ببطء وكذلك عندما يفرغ من المحقنة إلى الأنبوب الخاص بالحفظ يفرغ ببطء وذلك لمنع تكسر كريات الدم .
- (5) يجب عدم المبالغة في استخدام المواد المانعة للتجلط (التخثر) .
- (6) بعد سحب العينة يجب الإسراع بنقلها إلى المختبر حيث أن حفظ الدم في درجات حرارة منخفضة يؤدي إلى تحلل الخلايا واضطراب توزيع الأيونات بصورة خاصة.

✚ مضادات التخثر (موانع التجلط) Anticoagulants

تستخدم مضادات التخثر في حالة استعمال عينات من البلازما أو الدم الكلي حسب ما تقتضيه التجربة وعليه يجب استخدام انابيب جمع الدم خاصة حاوية على مواد مضاد للتخثر ووضع العينة فيها حال سحبه مباشرة ، وتجدر الإشارة إلى أن اختيار مضاد التخثر يجب أن يقوم على اعتبار أن هذا المضاد لن يؤثر على التحليل الكيميائي وهذه النقطة مهمة جداً. لأن مصادر التخثر هي مركبات كيميائية لأملاح بعض المعادن مثل الصوديوم والبوتاسيوم والليثيوم ، لذلك لا يمكن استخدام مضادات التخثر من أملاح الصوديوم والبوتاسيوم عندما يخص التحليل تعيين الإلكتتروليتات كالصوديوم والبوتاسيوم لأن ذلك سوف يؤدي إلى خطأ إيجابي أكبر في نتائج التحليل ولكن في مثل هذه الحالة يمكن استخدام مضادات التخثر لليثيوم أو الأمونيوم .

أما في حالة تحليل الكالسيوم في الدم فلا يمكن استخدام أكرالات الصوديوم لأن هذا الملح سوف يزيل كل ما تحتويه العينة من الكالسيوم بترسيبه على شكل أكرالات الكالسيوم .

وكذلك تعمل مضادات التخثر على تثبيط فعالية بعض الإنزيمات ، مثل إنزيم الفوسفاتاز الحمضي Acid Phosphatase والفوسفاتاز القاعدي Alkaline Phosphatase وأنزيم نازعة الهيدروجين من لاكتات LDH أما أملاح فلوريد البوتاسيوم أو الصوديوم فتثبط فعالية إنزيم اليوريز بينما تنشط فعالية إنزيم الأميلاز ، كما تستطيع مضادات التخثر إفقاد الاختبار أهميته المرضية .

بعض أنواع المواد المخثرة للدم :

(1) الهيبارين Heparin :

مادة مضادة للتخثر وهو من مكونات الدم الأساسية الا انه يوجد بتركيز لا يكفي لمنع تخثر الدم ، يتولد الهيبارين من خلايا الكبد فهو موجود بتركيز عالي في الكبد كما أنه موجود أيضا في الخلايا الرئوية وقد أمكن فصله وعزله بشكل ملح متبلور من مستخلص الكبد والرئة ، يتميز عن غيره بكونه لا يتداخل معه أي اختبار من اختبارات التحليل الكيميائي .

الهيبارين عبارة عن ميكوتين عديد حمض الكبريتيك Mucicoitin Polysulphouric – Acid وهو من السكريات المتعددة ويمكن الحصول عليه تجاريا في الوقت الحاضر من أملاح الصوديوم Sodium Heparin أو ملح البوتاسيوم Potassium Heparin أو ملح الليثيوم Lithium Heparin . يعمل الهيبارين كمضاد للثرومبين Antithrombin اذ يمنع نقل أو تحويل البروثرومبين Prothrombin إلى ثرومبين Thrombin وهكذا يمنع تكوين الفايبرين Fibrin إلى الفايبرينوجين Fibrinogen وتتم عملية التجلط على مرحلتين كالتالي :

Prothrombin → Thrombplastic Activity Factor → Thrombin
Fibrinogen → Thrombin → Fibrin (blood clot)
ويحتاج الهيبارين إلى عامل مساعد Cofactor للقيام بعمله .

يضاف الهيبارين بنسبة 20% وحدة لكل مليلتر من الدم، وبما أنه لا يذوب في الحال لذا فإن محلوله غالباً ما يستخدم ويجفف، على جدران الأنبوبة ليكون في تماس مباشر مع الدم ومفعوله أفضل ما يمكن، ولا تزال أسعاره المرتفعة ومفعوله المؤقت من معوقات استخدامه في المختبرات إذا ما قورن بمضادات التخثر الأخرى، ويحتوي هيبارين الصوديوم على ما لا يقل عن 110 وحدة/ ملغم ويستعمل عادة بتركيز حوالي 0.2 ملغم/مل من الدم .

(2) إكزالات البوتاسيوم Potassium Oxalates :

تعمل إكزالات البوتاسيوم على ترسيب أيونات الكالسيوم وبذلك يمنع تجلط الدم ويفضل استعماله لسهولة ذوبانه ، عادة من 10 – 20 ملغم من إكزالات البوتاسيوم تمنع تجلط 10مل من الدم و 2 ملغم لكل واحد مل من الدم ويستعمل هذا المحول عادة بتركيز 30% ويعاير إلى الرقم الهيدروجيني pH = 7.4 بإضافة محلول هيدروكسيد البوتاسيوم أو محلول حمض الاكزاليك ومن الجدير بالذكر أن 0.1 مل من محلول إكزالات البوتاسيوم المحمر تكفي لمنع تخثر 10 مل من الدم.

(3) فلوريد الصوديوم Sodium Fluoride :

يستعمل كمادة حافظة من أجل تقدير الكلوكوز في الدم إلا أنه يستخدم كمضاد للتجلط (ضعيف)، وعندما يستخدم كمادة حافظة بالإضافة إلى وجود مانع للتجلط مثل إكزالات البوتاسيوم فإنه يكون مؤثر بتركيز حوالي 2 ملغم/ 1 مل من الدم ويبدأ تأثيره عن طريق تثبيط النظام الانزيمي المشترك في عملية Glycolysis الذي يؤدي إلى قلة تركيزه،

وتحضر الأنابيب الحاوية لهذا المزيج بإذابة 4 غم من كلوريد الصوديوم مع 12 غم من إكزالات البوتاسيوم في 200 مل من الماء، توضع قطرة واحدة في كل أنبوب لكل 1 مل من الدم وتجفف الأنابيب بدرجة حرارة أقل من 100 م .
كقاعدة عامة الفلوريد يجب ألا يستخدم عندما يكون جمع العينات من أجل تقديرات إنزيمية أو عندما يستخدم ككاشف Reagent في الاختبار (الطول الإنزيمية) مثل طريقة اليوريز Urease لتقدير اليوريا .

(4) إيثلين ثنائي الأمين رباعي حمض الخل Ethylene Diamine Tetra :Acetic Acid (EDTA)

يفضل استخدام هذا المضاد في اختبارات علم الدم Hematology بصورة خاصة حيث يعمل على المحافظة على المكونات الخلوية من التلف ويستخدم عادة بشكل ملح ثنائي الصوديوم أو ثنائي البوتاسيوم بتركيز يقارب من 1 - 2 ملغم/ مل من الدم ، تعزى فعالية هذا الملح كمضاد للتخثر إلى قابليته للارتباط مع كالسيوم الدم وعزله كلياً عن القيام بدوره في عملية التخثر .

بعض شروط جمع العينات

- (1) **دهون الدم :** يشترط الصيام من 12 - 14 ساعة وذلك إكمال امتصاص الدهون بالدم وأخذ النسبة الطبيعية بالدم لا يمنع في شرب القليل من الماء فقط.
- (2) **سكر صائم :** يشترط الصيام من 6 - 8 ساعات وذلك لاكمال احتراق السكر وأخذ النسبة والمريض صائم.
- (3) **سكر بعد الأكل بساعتين :** يشترط احتساب الساعتين من بداية الأكل وذلك لبدء إفراز الأنسولين مع بداية الأكل ويشترط الانتهاء من الأكل خلال 10 دقائق علي الأكثر وإذا كان المريض يأخذ علاج للسكر يتم أخذ العلاج إلا إذا كانت هناك تعليمات خاصة من الطبيب المعالج ويمكن شرب الماء فقط أثناء الساعتين.
- (4) **بول الحمل :** يفضل أول بول في الصباح وذلك لأن هرمون الحمل يكون أكثر تركيزاً مع عدم تناول أي سوائل مساء اليوم السابق وذلك حتى لا يخفف تركيز الهرمون إذا كانت النتيجة سلبية نقترح إجراء اختبار الحمل عن طريق الدم HCG وذلك لأن هذا الاختبار أكثر حساسية.
- (5) **زرع البول:** يشترط غسل اليد والأعضاء التناسلية بالماء والصابون وتطهير فتحة البول بالديتول أو أي مطهر ثم تغسل مرة أخرى بالماء لإزالة الديتول الزائد ثم نفرغ أول نقط بول في دورة المياه ونضع الباقي في العلبة المعقم الذي يوفره المعمل كما يفضل الامتناع عن أخذ أي مضاد حيوي لمدة 48 ساعة لكي نعطي للميكروب فرصة للنمو (في حالة إرسال العينة من المنزل يجب أن تصل إلى المعمل في خلال ساعتين علي الأكثر حتى لا يموت الميكروب أو نمو ميكروبات أخرى - كما أنه يكتب على ورقة التحليل أحضرت العينة من المنزل) في حالة اخذ أي مضادات حيوية يفضل كتابة اسم المضاد كذلك على ورقة التحليل .

(6) **تجميع بول 24 ساعة:** فور القيام من النوم يقوم المريض بإفراغ المثانة كاملة في الحمام ثم يقوم بتجميع كل نقطة بول في زجاجة كبيرة أو جركن كبير أو العلبة الكبيرة وذلك حتى اليوم التالي في نفس الميعاد ويحفظ البول في درجة حرارة الغرفة ولا تكون الحرارة عالية أو منخفضة .

(7) **بول 3 أيام متتالية أو بصاق 3 أيام متتالية:** يعمل هذا التحليل للكشف عن ميكروب الدرن في عينات لأن الميكروب من الممكن أن يظهر في عينة ولا يظهر في عينة أخرى.

(8) **تحليل المنى:** يشترط الامتناع عن الجماع أو الاحتلام لمدة 4 أيام متتالية وذلك حتى لا تتأثر الكمية كما يفضل إعطاء العينة في المعمل مع الاهتمام بوضع النقط الأولى من المنى في الزجاجة الخاصة بذلك لأن هذه النقط بها $\frac{3}{4}$ العد أما إذا أحضرت العينة من المنزل يكتب ذلك بخط واضح علي ورقة التحليل كما يدون وقت إحضار العينة ولا يسمح بقبول عينة من المنزل مر عليها أكثر من 20 دقيقة.

(9) **البروستاتا أو مسحة القضيب:** هذه العينات يجب الحجز لها بموعد سابق ويشترط حجز بول لمدة ساعة وذلك لأن في البروستاتا لأخذ بول قبل البروستاتا للفرقة هلي الصديد من القضيب أو البروستاتا أو من البول. أما مسحة القضيب يجب أن يكون مجرى البول جاف تماما حتى نتأكد أن الميكروب الموجود من القضيب وليس من البول.

(10) **مسحة أمراض النساء HVS :** هذه العينة بموعد سابق ويشترط عدم الجماع لمدة يومين حتى نتأكد أن الميكروب من الرحم وليس من المنى وعدم غسيل المهبل يوم إجراء التحليل حتى نعطي فرصة للميكروب للنمو مع الامتناع عن أي مضاد حيوي لمدة 48 ساعة.

(11) **زرع البراز:** يشترط وصول العينة إلي المعمل في خلال ساعتين على الأكثر لأن هناك بعض الميكروبات التي تموت بعد فترة من الوقت ولا تقبل عينات في الفوط الصحية لأنها تمتص السوائل من العينة والجفاف يقتل الميكروبات ويفضل الامتناع عن المضاد الحيوي لمدة 48 ساعة وإذا حضرت العينة من المنزل يذكر ذلك.

(12) **دم البراز الخفي:** يمتنع المريض لمدة 48 ساعة عن تناول جميع أنواع اللحوم الحمراء أو الكبد أو الفجل أو أدوية الروماتيزم أو أدوية تحتوي علي الأسبرين أو فيتامين ج أو الكورتيزون أو الحديد كما لا يسمح بأخذ ملينات والحلويات.

تعريف الدم بشكل بسيط مع مكوناته

الدم هو سائل لزج معتم يملأ الأوعية الدموية ويندفع إلى جميع أجزاء الجسم بفضل انقباض عضلة القلب وهو من الأنسجة الضامة.

وظائف الدم :

(1) **عملية التنفس:** يحمل الدم الأكسجين من الرئتين إلى الأنسجة وكذلك ثاني أكسيد الكربون المتولد من نشاط الأنسجة إلى الرئتين في هواء الزفير التغذية : يحمل الدم

المواد الغذائية الأولية التي تمتصها الأمعاء إلى الخلايا المختلفة لاستعمالها في إنتاج الطاقة اللازمة لنشاط الجسم .

عملية الإخراج:

يقوم الدم بحمل الفضلات الضارة المتبقية نتيجة لعملية التمثيل الغذائي في الجسم وذلك من خلال أجهزة الإخراج كالكلية والجلد فيتخلص منها الجسم عن طريق البول والعرق .

(2) المناعة : يحتوى الدم على خلايا الدم البيضاء التي تتولى الحماية كما أنه ينتج الأجسام المضادة التي تقوم بدور أساسي في حماية الجسم ووقايته من الأمراض

(3) التوازن المائي للجسم: ينتقل الماء بسهولة بين سوائل الجسم المختلفة سائل الخلايا وسائل ما بين الخلايا ويساعد الدم في حفظ توازن الماء بالجسم بحمل الماء الزائد لأجهزة الإخراج بحيث يكون هناك اتزان بين ما نحصل عليه من ماء عن طريق الشراب والطعام وبين ما نفقده عن طريق البول والعرق

(4) تنظيم درجة حرارة الجسم: يقوم الدم بامتصاص الحرارة من الأعضاء الداخلية والعضلات وأثناء انتقاله منها إلى الأعضاء الخارجية وتحت الجلد يمكن للجسم أن يتخلص من الحرارة الزائدة عن طريق الإشعاع والحمل والتبخر.

(5) تنظيم عملية التمثيل الغذائي: يحمل الدم الهرمونات وبعض المواد الهامة اللازمة لتنظيم عملية التمثيل الغذائي في الجسم. حفظ الضغط الأسموزي للدم وسائر الأنسجة : وذلك بفضل بروتينات البلازما هذا الضغط لازم لحفظ حجم الدم وتكوين سائل الأنسجة والبول تركيب الدم

* الدم سائل أحمر يبلغ حجمه حوالي 5-6 لترات في الشخص البالغ وهو يتكون من مادة سائلة تسمى البلازما يسبح فيها ثلاثة أنواع من الخلايا هي:

✓ خلايا الدم الحمراء.

✓ خلايا الدم البيضاء.

✓ الصفائح الدموية.

عند منع الدم من التجلط وتركه جانباً نجد أن الخلايا تهبط إلى القاع لعلو كثافتها تاركة البلازما في الجزء العلوي كسائل شفاف مائل للاصفرار وقد وجد أن حجم الخلايا = 45% من الدم، أما حجم البلازما فهو 55% وهذا يسمى قيمة الهيماتوكريت.

كرات الدم الحمراء:

هي كرات على شكل أقراص مقعرة السطحين لها جدار رقيق وليس لها نواة ، تحتوى

بداخلها على مادة الهيموجلوبين وهي عبارة عن مركب من الحديد والبروتين والهيموجلوبين هو الذي يعطى الدم لونه الأحمر ومن مميزات هذا المركب أنه سهل الاتحاد بالأكسجين ولذلك سميت كرات الدم الحمراء حاملة الأكسجين وعدد كرات الدم الحمراء في الرجل حوالي خمسة مليون خلية في المليتر المكعب أما عددها في المرأة فهي حوالي أربعة ونصف مليون في المليتر المكعب. وعندما يتشبع



بالأكسجين يصبح لونه أحمر قانيًا وذلك لتكوّن مادة الاوكسوهيموجلوبين وهذا يحدث عند تعرض الدم لضغط عالٍ من الأكسجين كما يحدث في الرئتين وعندما يتعرض الأوكسوهيموجلوبين إلى ضغط منخفض من الأكسجين كما يحدث في الأنسجة فإنه يفقد جزءًا من أكسجينه ويصبح الدم لونه مائلاً للزرقة والهيموجلوبين يتحد أيضًا مع ثاني أكسيد الكربون في الأنسجة ويتخلّى عنه في الرئتين ولذلك فإننا نجد الدم في الشرايين أحمر اللون بينما نجده مائلاً للزرقة في الأوردة.

مكان تكوين كرات الدم الحمراء :

يبدأ تكوين خلايا الدم الحمراء من الأسبوع الرابع من الحمل وحتى الشهر السادس منه في الطحال والكبد وفي الأشهر الثلاثة الأخيرة من الحمل تتكون هذه الكرات في نخاع العظام وقليلًا منها في الطحال والكبد . وفي الأطفال والبالغين تتكون كرات الدم الحمراء في نخاع العظام الأحمر الموجود في العظام المفطحة كعظام الوجه والكتف والجمجمة والضلع والعمود الفقري ونهايات العظام الطويلة في الجسم كعظمة الفخذ والعضد.

مصير كرات الدم الحمراء :

تؤدي هذه الكرات وظيفتها لمدة زمنية محدودة وهي حوالي 120 يومًا ، وبعد ذلك يلتقط الطحال الكرات التي هزمت والمتكسرة ليحلّ محلها فيخرج منها مادة الهيموجلوبين ويتم أيضًا تحليل الهيموجلوبين لتكوين الصبغات الصفراوية التي يتخلص منها الدم بطردها مع عصارة الصفراء. وكرات الدم التي تنكسر يحل محلها في الحال كرات جديدة في نخاع العظام .

عوامل تكوين خلايا الدم الحمراء:

العوامل التي يجب توافرها:

حتى يمكن تكوين خلايا الدم الحمراء:

- (a) يجب أن يكون نخاع العظام سليمًا، ولذلك فإذا أصابه أي مرض أو تلف كما يحدث في حالة التعرض لأشعة اكس أو الإشعاعات الذرية أو بعض السموم فإن ذلك يؤدي إلى نقص في عدد كرات الدم الحمراء.
- (b) يجب أن يحتوى الغذاء على عنصر الحديد لأنه يدخل في تركيب مادة الهيموجلوبين ويوجد الحديد في السبانخ والبقول والتفاح واللحوم وصفار البيض وإذا لم يتوفر الحديد في الغذاء أو لم يتمكن الجسم من الاستفادة من الحديد في الغذاء يصبح لون الدم باهتًا وهذا ما يحدث في أحد أنواع الأنيميا ويسهل علاجها بإعطاء المريض أدوية تحتوى على مركبات الحديد.

- (c) يجب أن يحتوى الغذاء على فيتامين ب12 الذي يطلق عليه العامل المانع للأنيميا الخبيثة وقد وجد أن هذا الفيتامين يتحد مع عامل آخر وهو العامل الداخلي والذي تفرزه المعدة ثم يمتص من الأمعاء

ويخترن في الكبد إلى أن يستخدمه نخاع العظام وهذا الفيتامين هام جدا لاستكمال نمو خلايا الدم الحمراء وظائف خلايا الدم الحمراء

(d) عن طريق مادة الهيموجلوبين تحمل كرات الدم الحمراء الأكسجين من الرئتين إلى الأنسجة وتحمل ثاني أكسيد الكربون من الأنسجة إلى الرئتين للتخلص منه .

(e) المحافظة على مادة الهيموجلوبين داخل كرات الدم الحمراء حتى لا تتحلل وتتحول إلى صبغات صفراوية أو تفرز في البول . ج - تقوم كرات الدم الحمراء بدور هام في تنظيم تفاعل الدم . خلايا الدم البيضاء وتختلف الخلايا البيضاء بعدم وجود الهيموجلوبين، ولكنها تتميز عنها بوجود نواة ، وفي الحقيقة فإن اللون الأصلي لهذه الخلايا يعتبر شفافا لكنه نتيجة لانعكاس الضوء فهم يظهرون تحت المجهر باللون الأبيض .

عدد الخلايا:

يبلغ عددها من 4.000 إلى 10.000 في المليتر المكعب من الدم أنواع الخلايا البيضاء في الدم يمكن تمييز خمسة أنواع من الخلايا البيضاء تحت المجهر، وهذا التمييز يعتمد على شكل النواة وأقسامها وعلى نوع الصبغة التي تكتسبها الخلية.

(1) خلايا محبة Granulocytes وتشمل:

(a) خلايا المتعادلة Neutrophil وتشكل 60-70 % من الخلايا البيضاء وبمتوسط عدد 4150 خلية/ μ l .

(b) خلايا الحامضية Eosinophil تشكل 2 - 4 % من خلايا الدم البيضاء بمتوسط عدد 165 خلية/ μ l .

(c) خلايا قاعدية Basophil تشكل 0.5 - 1 % من خلايا الدم البيضاء بمتوسط عدد 44 خلية.

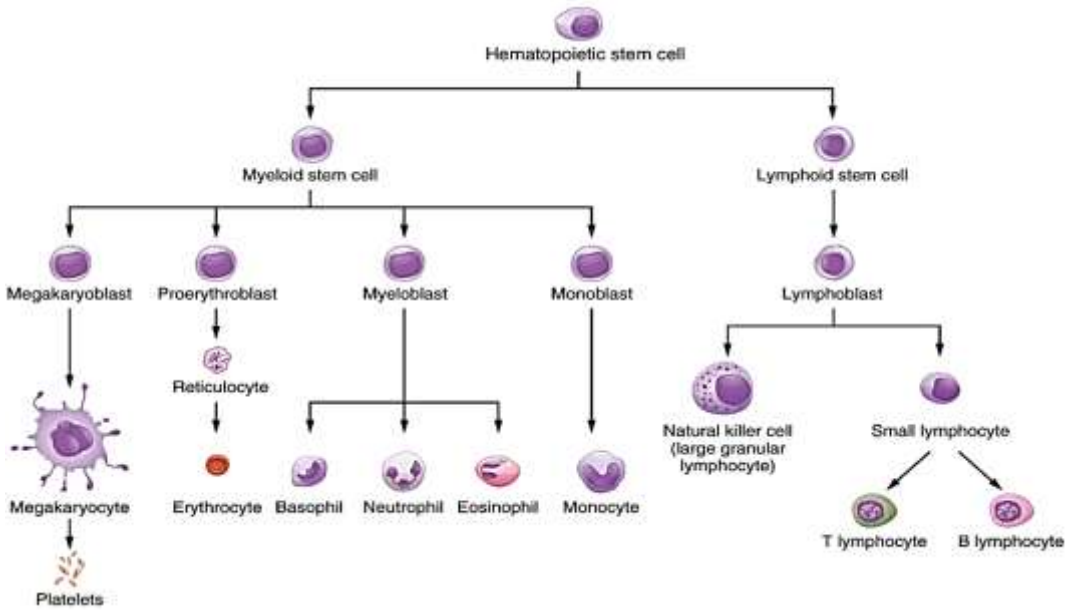
(2) خلايا الدم البيضاء غير المحبة A granulocyte وتشمل:

(a) الخلايا اللمفاوية Lymphocyte تشكل 20 - 40 % من خلايا الدم البيضاء ، بمتوسط عدد 2185 خلية/ ماكروليتر .

(b) خلايا وحيدة النواة Monocytes تشكل من 1 - 6 % من خلايا الدم البيضاء ، بمتوسط عدد 456 خلية / ماكروليتر

الصفائح الدموية (خلايا التخثر) (Platelets Thrombocytes)

ليست خلايا لكنها قطع من خلايا منتجة للخلايا الكبيرة Megakaryocytes ، يبلغ قطرها 2-4 μ m تكون قادرة على الحركة الاميبية والبلعمة (Phagocytosis) تحوي عوامل عديدة تشترك في وظيفة الصفائح الدموية. في الانسان تراوح عددها بين 150,000 - 350,000 صفيحة / ماكروليتر من الدم



شكل (1-3) مخطط تكوين الدم

طريقة سحب الدم

(1) معلومات طلب التحليل:-

يجب ان تكون معلومات طلب التحليل كاملة بواسطة الباحث قبل توجه المريض للتحليل . ويجب عليك ان تكون متأكد من جميع معطيات الطلب قبل سحب الدم ، مع مراعاة الاتي في الطلب قبل سحب العينه:-

- التأكد من اسم المريض
- موقع المريض (قادم للتحليل فقط – محجوز داخل المستشفى – متابعة بعد عملية او اخذ دواء)
- التحاليل المطلوبة .
- بعض المعلومات قد تكون ضرورية مثل (العمر - الجنس - امراض مزمنة)
- تأكد من وجود اي طلبات خاصة مثل (ضرورة وضع العينة في الظلام بعد السحب – حفظها في درجة حرارة منخفضة)

(2) المعدات اللازمة لسحب الدم:-

يجب توفر المعدات ادناه قبل السحب او جمع العينة :

(a) الانابيب Evacuated tubes

(b)	الحقنة Syringe
(c)	تورنيكه Tourniquet
(d)	كفوف طبية Gloves
(e)	كحول تعقيم ALCOHOL

البدء فى السحب :-

- (1) اطلب من المريض ان يمد يده بحيث يكون وجه اليد لافى.
- (2) اربط التورنيكه فى المكان بين الكوع والكتف between elbow and shoulder .
- (3) يجب ربط التورنيكه بقوة كافية حتى يتضح الوريد.
- (4) لو كان المريض يعانى من مشاكل جلدية تربط التورنيكه فوق الملابس او قطعة من القماش.
- (5) اختار مكان الوريد بعناية.
- (6) تجنب الاماكن المحروقة من الجلد ان وجدت.
- (7) لو كان المريض ياخذ حقن فى الوريد يجب اختيار وريد اخر او اليد الأخرى.
- (8) يحدد مكان الوريد بالنظر واللمس ولكن القدرة على معرفة مكان الوريد باللمس اهم من القدرة على معرفته بالنظر وهذه طبعا تأتى بالخبرة.
- (9) اطلب من المريض ان يغلق قبضة يده.
- (10) اقصى مده لربط التورنيكه هى دقيقه واحدة.
- (11) لو كان من الصعوبة ايجاد الوريد سوف تكون أسهل بعد تدليك اليد من الرسغ الى الكوع مما يدفع الدم الى الوريد.
- (12) نظف مكان الوريد بقطعة من القطن المضاف اليها الكحول تركيز 70% واسمح له ان يجف.
- (13) لا تلمس المكان بعد ان تم تنظيفه.
- (14) افرد مكان الوريد بأصبعك باليد اليسرى.
- (15) ضع أحد الاصابع قبل مكان الوريد.
- (16) انزل سن النيدل باليد اليمنى فوق اصبع اليد اليسرى حتى تاخذ الحقنة زاوية 45 درجة.
- (17) اسحب .
- (18) اخرج السن و ضع قطعة من القطن.

تحاليل الدم :

تحاليل الدم من الفحوصات الضرورية التي تسهم في الكشف عن وجود بعض الامراض في الجسم ، يقوم هذا الإجراء المختبري على تحليل عينة من الدم يتم سحبها بحقنة مخصصة لهذه الغاية عن طريق الوريد بعد التأكد من توافر شروط التعقيم والنظافة، على أن تظهر النتيجة أجزاء الدم ومكوناته ووظيفة كل جزء منه فيعرف الطبيب من خلال الأرقام التي تظهر ما إذا كان يعاني المريض من مشكلة ما، أم أن المعدلات لديه ضمن المستوى المطلوب. ورغم أن غالبية الناس لا يجرون تحاليل الدم إلا عند ظهور الأعراض المرضية، إلا أن الأطباء ينصحون الأشخاص الأصحاء بإجراء التحاليل بشكل دوري كل ستة أشهر للاطمئنان على الصحة العامة وللكشف عن أي حالة مرضية قبل تفاقمها لأن أي خلل قد يعكس العديد من الأمراض بداية من الأنيميا البسيطة ووصولاً إلى السرطان.

ان النتائج التي يظهرها تحليل الدم يعطي الطبيب المعالج العديد من المعلومات حول كل نوع من الخلايا؛ أول تلك المعلومات هو العدد حيث أن عدد خلايا الدم الحمراء يتراوح بين الأربع ملايين ونصف إلى الخمس ملايين في الذكور، بينما يقل المعدل قليلاً في الإناث لنجده يتراوح بين الأربع ملايين والأربع ملايين ونصف، كما يتم قياس الحجم المتوسط لكرة الدم الحمراء من خلال تحليل الدم ويتم تحديد نوع الأنيميا بناء على الحجم إذا كان أكبر أو أصغر من الحجم الطبيعي المتوقع للخلية.

تحليل الدم الشامل يكشف الكثير عن صحة الإنسان في حال كان مصاباً بأحد الأمراض المزمنة، او ميكروبات أو فيروسات تؤثر سلباً على صحته الجسدية، كما يكشف هذا التحليل عن الأمراض المتوارثة او المكتسبة، او وجود أي نقص في الفيتامينات او العناصر الأساسية التي يحتاجها الجسم، وبذلك يساعد على كشف العديد من النواقص التي يجب معالجتها بسرعة لاستعادة العافية والسلامة للجسم. كما يسهم هذا الفحص أيضاً في تحديد قوة الدم ومدى سرعة تدفقه.

يشمل تحليل الدم الكامل قياس عدة مكونات رئيسية في الدم هي كالآتي:

عدد خلايا الدم البيضاء (WBC)

هو عدد خلايا الدم البيضاء في حجم الدم، قد يختلف المعدل الطبيعي بعض الشيء بين المختبرات ولكن بشكل عام يتراوح ما بين 4300 و10800 خلية في كل مليتر مكعب ويمكن أيضاً التعبير عنها في وحدة دولية كالآتي $4.3 - 10.8 \times 10^9$ خلية لكل لتر.

الأجهزة والمواد المستعملة :

- شريحة العد Haemocytometer .
- واخزة Lancet معقمة.

c. ماصة خاصة بتعداد الكريات البيضاء وتتكون من انبوبة شعرية مقسمة الى ثلاث تدريجات هي 0.5 و 10 و 11 بحيث تخفف الدم الى 20/1 مرة. يحتوي انتفاخها على خرزة صغيرة بيضاء اللون ويرتبط بها انبوب مطاطي.

d. محلول التخفيف ويسمى Turkeys Fluid ويتكون من :

- حامض الخليك الثلجي 1.5 مليلتر.
- صبغة المثيل البنفسجي.
- ✓ يعمل حامض الخليك الثلجي على تحليل كريات الدم الحمراء، بينما تعمل صبغة المثيل البنفسجي على صبغ انوية كريات الدم البيضاء ولكي يسهل تمييزها.



صورة (2-3) معدات سحب الدم

طريقة العمل :

1. تنظف الشريحة والغطاء بصورة جيدة ويتم فحصها تحت المجهر للتأكد من المربعات.
2. يعقم الإبهام ويترك لكي يجف ثم يوخز الإبهام باستخدام الابرة المعقمة يتم مسح القطرة الأولى من الدم لاحتمال امتزاجها مع الكحول ثم يترك الدم ليخرج بحرية.
3. توضع النهاية الدقيقة للماصة على قطرة الدم ويمتص الدم برقة من خلال الانبوب المطاط الى حد العلامة 0.5 ويتم التأكد من خلو الدم من الفقاعات ويسحب مباشرة محلول التخفيف الى حد العلامة 11.
4. يتم مزج المحلول بمسك الماصة بشكل أفقي وتحريكها بهدوء وتساعد الخرزة البيضاء في عملية المزج وتستمر العملية لمدة دقيقة واحدة تقريباً.
5. نتخلص من القطرات الأولى من المحلول لحد العلامة 1.0 لاحتمال عدم امتزاجها جيداً ثم تمسك الماصة بزاوية 45° مع الشريحة وتوضع قطرة من المحلول عند حافة غطاء الشريحة عندها يلاحظ انتشار القطرة بطريقة الخاصة الشعرية ويجب التخلص من الفقاعات إن وجدت.
6. يتم فحص الشريحة تحت المجهر باستخدام العدسة الشيئية الصغرى ثم تحت القوة الكبرى.
7. يشمل حساب كريات الدم البيضاء مجموع الكريات الواقعة ضمن المربعات الكبيرة الأربعة في الأطراف ويحوي كل منها على 16 مربع متوسط.

الحسابات : Calculation

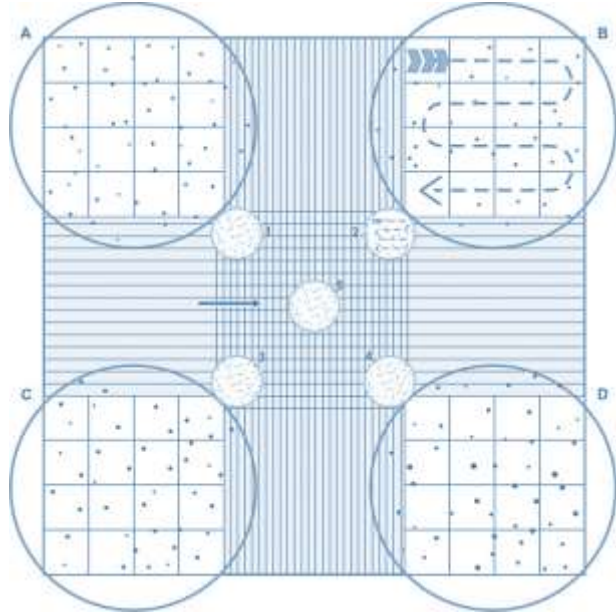
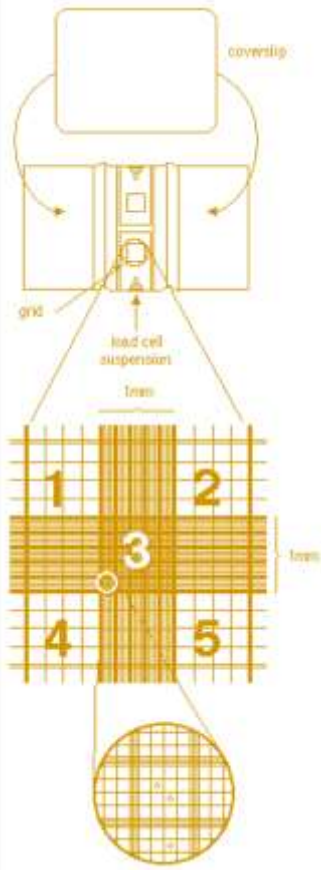
بما أن مساحة كل مربع كبير هي 1 ملم² وعمق الشريحة هو 10/1 ملم فإن حجم السائل في كل مربع كبير $= 0.1 \times 1 = 0.1$ ملم³

حجم المربعات الأربعة التي يتم فيها العدد $= 0.1 \times 4 = 0.4$ ملم³

لو فرضنا بأن عدد الكريات البيضاء التي تم حصرها في المربعات الأربعة هو n فإن n كرية بيضاء موجودة في 0.4 ملم³ من الدم المخفف.

بما أن نسبة التخفيف هي 20/1 $(20/1 = 10/0.5 = (1-11)/0.5)$

ان عدد كريات الدم البيضاء الموجودة في 1 سم³ من الدم = $20 \times \frac{10}{4} = n \times 50$ في حالة الدقة باجراء التجربة اذا لوحظت زيادة أو نقصان في عدد كريات الدم البيضاء فغالباً ما تكون هناك حالة مرضية معينة. كما التعداد الطبيعي لكريات الدم البيضاء لا يعني دائماً عدم وجود حالة مرضية. ان زيادة عدد كريات الدم البيضاء تدعى Leukocytosis بينما حالة نقصان العدد تدعى Leukopenia .



شكل (3-3) رسم تخطيطي يوضح طريقة العد

العد التفصيلي لخلايا الدم البيضاء (white blood cell differential count (WBC) cell

يتألف الدم الأبيض من أنواع عدة، حيث يتم التمييز بينها استناداً إلى حجم الخلايا وشكلها في العد التفاضلي. وهي المحببة والخلايا الليمفاوية وحيدات والحمضات والأسسة. في حال أظهر الفحص زيادة في عدد كريات الدم البيضاء عن المعدل الطبيعي، فذلك يعني وجود عدوى في الجسم أو ورم خبيث في حال كانت الزيادة بشكل كبير جداً؛ أما نقصها، فذلك يعني وجود مشكلة في نخاع العظمي أو استخدام بعض الأدوية مثل العلاج الكيماوي.

هناك طرق عديدة لتحضير أفلام دموية لمعرفة الحساب التمييزي لكريات الدم البيضاء. والطريقة الأكثر استعمالاً هي تحضير مسحة من الدم على شريحة زجاجية وتتلخص كما يلي :

- 1- يتم الحصول على نموذج الدم بتنظيف الإصبع وتعقيمه بالكحول ويوخز بعمق 2-3 ملمتر باستخدام إبرة معقمة. بعد خروج الدم تهمل القطرات الأولى ويجب عدم الضغط على الإصبع للحصول على قطرة الدم على الإطلاق وإنما تترك قطرة الدم تخرج بحرية.
- 2- توضع الشريحة على سطح مستو وتوضع عليها قطرة من الدم. وتحمل شريحة زجاجية ثانية بين الإبهام والسبابة وتوضع حافة الشريحة أمام قطرة الدم على أن تكون الزاوية بين الشريحتين بحدود 45° كما يجب أن تكون حافة الشريحة الثانية ملساء لأن الحافة الخشنة تنتج عنها مسحة غير جيدة.
- 3- تحرك الشريحة العليا قليلاً الى الخلف ولفترة قصيرة بحيث تنتشر قطرة الدم على الشريحة السفلى وكذلك على حافة الشريحة العليا.
- 4- تحرك الان الشريحة العليا ببطء على الشريحة السفلى، وكلما كانت حركة الشريحة بطيئة كلما كانت المسحة الناتجة أكثر رقة.
- 5- بعد ذلك تموج الشريحة الحاوية على المسحة في الهواء لكي تجف.
- 6-

تصبغ المسحة باستخدام صبغة لushman : Leishman Stain :

- 1- تسكب صبغة لushman على الشريحة وتحرك بصورة أفقية بحيث تغطي المسحة بأكملها. احسب عدد قطرات الصبغة المستخدمة.
- 2- اترك الصبغة تتفاعل لمدة دقيقة واحدة.
- 3- عند انتهاء الدقيقة، أضف ماء مقطر ضعف كمية الصبغة (من خلال مضاعفة عدد قطرات الصبغة).
- 4- يجب مزج خليط الصبغة والماء المقطر باستخدام قطارة.
- 5- بعد مرور سبعة دقائق يتم سكب خليط الصبغة والماء المقطر وتغطي المسحة بالماء المقطر فقط ولمدة دقيقتين.
- 6- تغسل الشريحة بعدها بكمية من الماء المقطر أو ماء الحنفية لمدة خمس عشرة دقيقة.
- 7- تجفف الشريحة بعدها باستخدام ورق النشاف أو ورقة الترشيح.

تصبغ المسحة باستخدام صبغة جمزا Giemsa Stain :

- 1- تثبت المسحة الدموية بوضعها في كحول أثيلي نقي لمدة دقيقة الى دقيقتين ثم توضع في الصبغة لفترة 5-10 دقائق.
- 2- تغسل الصبغة بتيار من الماء المقطر ثم يتم التخلص من الماء وتترك الشريحة الى أن تجف في الهواء.

تصبغ المسحة باستخدام صبغة May – Grunwald او صبغة جنر Jenners : Stain

- 1- تثبت المسحة باستخدام الكحول المثللي لمدة خمس دقائق.
- 2- تضاف الى أحد الصبغتين أعلاه وتترك لمدة ثلاث دقائق ثم تغسل بتيار من الماء المقطر.
- 3- تضاف بعد ذلك صبغة جميزا المخففة وتترك لمدة 15 دقيقة أو أكثر.
- 4- تغسل الصبغة بعدها بالماء المقطر وتترك الشريحة لمدة دقيقة أو دقيقتين الى أن تظهر المسحة.
- 5- يتم التخلص من الماء وتترك الشريحة الى أن تجف في الهواء.

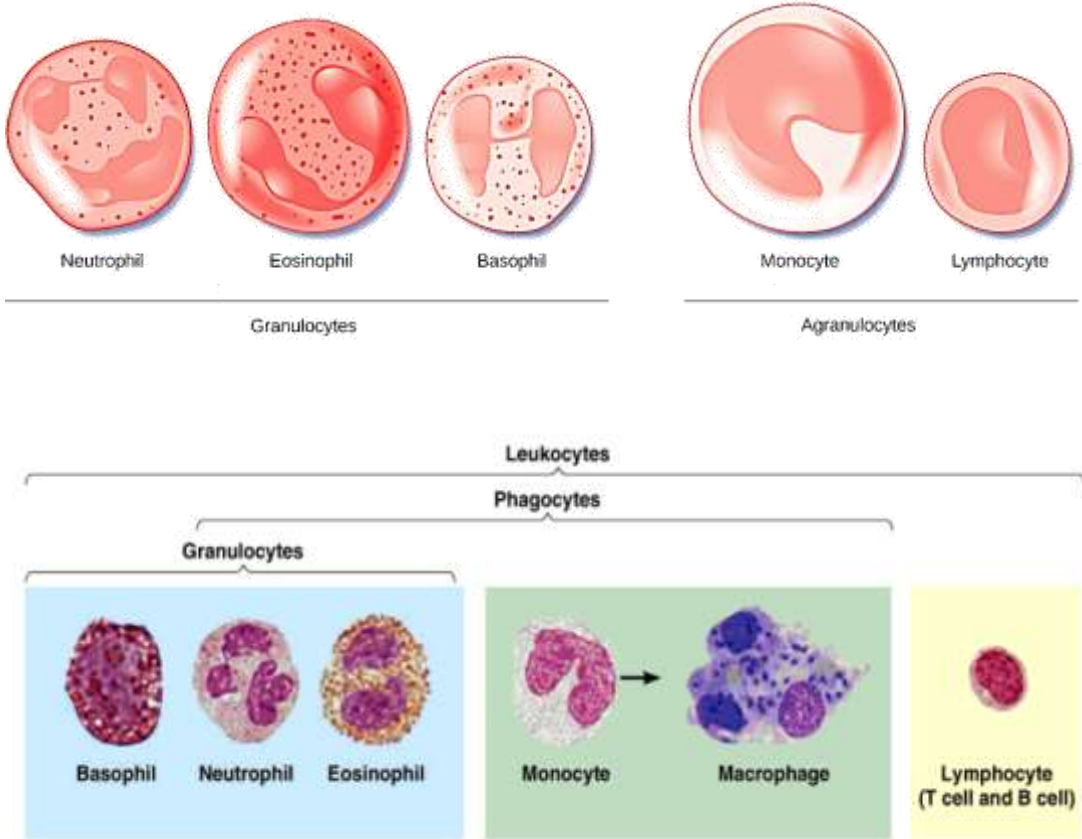
الفحص العام للمسحة المصبوغة :

- 1- ان الفحص العام للمسحة يجب ان يتم بالقوة الواطنة أولاً ومن ثم بالقوة الأعلى.
- 2- بما أن الكريات الحمراء تشكل الجزء الأكبر من المسحة، فإنه يجب ملاحظتها أولاً من حيث العدد والحجم والشكل والصبغة.
- 3- بعدها تلاحظ الكريات البيضاء.

فحص الشريحة لغرض الحساب التمييزي للكريات البيضاء :

- 1- ان فحص المسحة للحساب التمييزي للكريات البيضاء يجب أن يتم تحت العدسة الزيتية أو تحت القوة الكبرى.
- 2- ان حساب الكريات البيضاء يجب أن يتم بطريقة بحيث أن الكرية لا تحسب مرتين أو يهمل حسابها. وهذه الطريقة يسيطر عليها بصورة نظامية كما موضح في الشكل أدناه:

3- يمكن حساب 100 أو 200 كرية بيضاء وتحسب النتيجة بإيجاد النسبة المئوية لكل نوع من الكريات البيضاء والتي تكون كما يلي :
70% متعادلة 22% لمفاوية ، 4% مونوسايت 3% حامضية و 1% قاعدية.



الصورة (3-4) اشكال كريات الدم البيض

الأخطاء التي تؤدي إلى زيادة أو نقص عدد كريات الدم البيضاء:

نفس الأسباب التي تم ذكرها عند عد كريات الدم الحمراء . لتلافي هذه الأخطاء يمكن عد عينه أخرى أو عدد أكبر من الكريات البيضاء.

أسباب الزيادة في عدد كريات الدم البيضاء:

1. زيادة فسيولوجية أثناء الحمل والولادة ، عقب مجهود عضلي وفي الأطفال حديثي الولادة (18000 – 25000/مم³).

2. زيادة مرضية – العدوي بالميكروبات العنقودية والسبحية مثل التهاب اللوزتين والرائدة الدودية والتهاب حوض الكلي – الدرن.

أمراض الحساسية والجلدية والطفيليات.

العدوي بالفيروسات.

الأورام الخبيثة وسرطان الدم.

أسباب النقص في عدد كريات الدم البيضاء:

العدوي ببعض الفيروسات.

فشل نخاع العظمي.

التيفود والباراتيفود.

المعدل الطبيعي:

الفئة النسبة / مم³

البالغين 4000 – 11.000 / مم³

أطفال (عام) 6000 – 18.000 / مم³

أطفال (4 – 7 أعوام) 5000 – 15.000 / مم³

أطفال (8 – 12 عام) 4.500 – 13.500 / مم³

عدد الخلايا الدم الحمراء (RBC)

يدل على عدد خلايا الدم الحمراء في حجم الدم، المعدل الطبيعي يختلف قليلاً بين المختبرات ولكنه عموماً يتراوح ما بين 4.2–5.9 مليون خلية في كل مليتر مكعب كما يمكن التعبير عنها في وحدة دولية كالآتي $4.2-5.9 \times 10^{12}$ خلية لكل لتر.

إن حساب عدد كريات الدم الحمراء في نموذج من الدم يتم باستخدام جهاز خاص يدعى بمقياس خلايا الدم أو Haemocytometer إذ يتم تخفيف كمية قليلة جداً من الدم لاستعمالها في الجهاز ومن ثم يمكن حساب العدد الكلي لكريات الدم الحمراء في الدم غير المخفف.

الأجهزة والمواد المستعملة :

1- مقياس خلايا الدم والمتكون من :

أ- إبرة Iacant لوخز الإصبع للحصول على عينة الدم.

ب- ماصة تخفيف الدم (ذات خرزة حمراء).

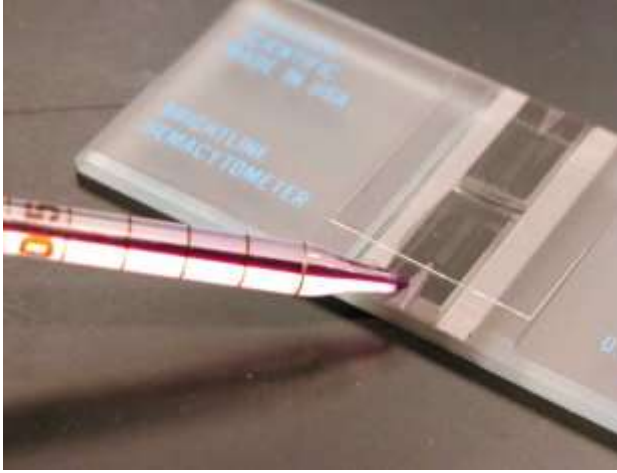
ج- شريحة العد والتي يوجد أنواع عديدة منها وأكثرها استعمالاً هو النوع المحسن Improved Neubauer.

2- محلول هايم للتخفيف Hayems fluid ويتكون من 0.25% كلوريد الزئبقيك HgCl_2 و 2.5% كبريتات الصوديوم Na_2SO_4 0.5% كلوريد الصوديوم NaCl وماء مقطر.

عدد الخلايا الدم الحمراء (RBC)

يدل على عدد خلايا الدم الحمراء في حجم الدم، المعدل الطبيعي يختلف قليلاً بين المختبرات ولكنه عموماً يتراوح ما بين 4.2–5.9 مليون خلية في كل مليمتراً مكعب كما يمكن التعبير عنها في وحدة دولية كالآتي $4.2-5.9 \times 10^{12}$ خلية لكل لتر.

إن حساب عدد كريات الدم الحمراء في نموذج من الدم يتم باستخدام جهاز خاص يدعى بمقياس خلايا الدم أو Haemocytometer إذ يتم تخفيف كمية قليلة جداً من الدم لاستعمالها في الجهاز ومن ثم يمكن حساب العدد الكلي لكريات الدم الحمراء في الدم غير المخفف.



صورة (3-5) شريحة عد كريات الدم

الأجهزة والمواد المستعملة :

3- مقياس خلايا الدم والمكون من :

أ- إبرة Iacent لوخذ الإصبع للحصول على عينة الدم.

ب- ماصة تخفيف الدم (ذات خرزة حمراء).

ج- شريحة العد والتي يوجد أنواع عديدة منها وأكثرها استعمالاً هو النوع المحسن Improved Neubauer.

4- محلول هايم للتخفيف Hayems fluid ويتكون من 0.25% كلوريد الزئبقيك و $Hgcl_2$ 2.5% كبريتات الصوديوم Na_2SO_4 0.5% كلوريد الصوديوم Nacl وماء مقطر.

5- مجهر لإجراء العد.

ان شريحة العد هي عبارة عن شريحة زجاجية سميكة تتوسطها حفرة على شكل الحرف H. يوجد في الفراغ العلوي والسفلي من المنطقة الوسطى من حرف H مساحة عد counting area كل منها مقسمة الى مربعات مجهرية وكما يلي :

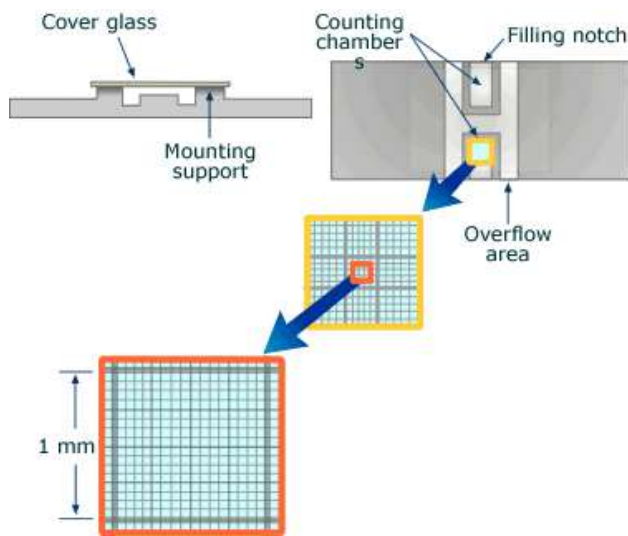
1- المربعات الكبيرة وعددها تسعة مربعات طول ضلع المربع الواحد 1 ملليمتر وبالتالي فإن مساحة المربع هي 1 ملليمتر مربع.

2- المربعات المتوسطة، ينقسم كل مربع كبير (فيما عدا المربع الوسطي) الى 16 مربع متوسط، بينما ينقسم المربع الوسطي بمفرده الى 25 مربع متوسط وتتفصل المربعات المتوسطة بعضها عن البعض بخطوط ثلاثية. يسمى المربع الوسطي الذي تحده خطوط ثلاثية بمربع حساب كريات الدم الحمراء، بينما تستخدم المربعات الأربعة الكبيرة الكائنة في الزوايا لحساب كريات الدم البيضاء ويمكن إضافة مربع وسطي خامس إليها.

3- المربعات الصغيرة ينقسم كل مربع متوسط من المربع المركزي الكبير الى 16 مربع صغير متوسط، وبالتالي فإن المربع الوسطي الكبير يتكون من 400 مربع صغير مساحة كل منها $400/1$ ملم² وتتفصل المربعات الصغيرة بعضها عن البعض بخطوط مفردة.

ان عمق الحفرة الكائنة في الشريحة هو 0.1 ملليمتر وعند وضع غطاء الشريحة فإن المربعات الصغرى تصبح على شكل غرف حجم كل منها $= 0.1 \times (400/1) = 400/1$ ملم³.



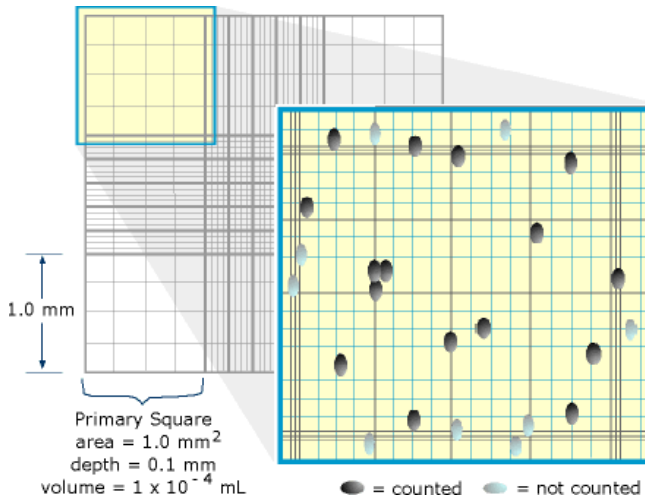


أما ماصة تخفيف الدم فهي عبارة عن ماصة شعرية تنتهي بانتفاخ يوجد فوقه عنق الماصة الذي يتصل بانبوب مطاطي يقسم مساحة الماصة إلى ثلاث تدرجات هي 0.5 و 1.0 و 1.1. إن الغرض من تخفيف الدم هو سهولة إجراء العد وذلك لاستحالة إجرائه باستعمال دم غير مخفف إذ تكون غرف العد مزدحمة تماماً بالكريات الدموية.

طريقة العمل :

تنظف الشريحة والغطاء بصورة جيدة ثم تجفف ويتم فحصها تحت المجهر للتأكد من التقسيمات (المربعات الكبيرة والمتوسطة والصغيرة) وباستخدام القوة الصغرى ثم يفحص بالقوة الكبرى ويتم التركيز على المربع المتوسط المركزي الذي يتكون من 16 مربع صغير ولاحظ أن هذا المربع محدد بثلاثة خطوط.

تعمق الإبرة والإصبع ثم يوخز الإصبع للحصول على قطرة دم كبيرة ثم تسحب قطرة الدم باستخدام الماصة حتى العلامة 0.5 وتكون عملية السحب بوضع نهاية الماصة بصورة مائلة على الإصبع وفي حالة تكون أية فقاعة يعاد دفع الدم ثم يسحب مرة أخرى. وفي حالة زيادة كمية الدم إلى أكثر من العلامة 0.5 يتم التخلص من الزيادة باستخدام ورقة ترشيح وتنظف نهاية الماصة تماماً.



يخفف الدم وبسرعة باستعمال محلول هايم إلى حد العلامة 101 وهذا المحلول يعمل على منع التخثر أو التكتل، كما أنه يعمل على حفظ الكريات الحمراء بشكلها الطبيعي (لأنه محلول متساوي التوتر (Isotonic solution).

بعد إنتهاء عملية التخفيف يتم نزع الانبوب المطاطي وتغلق نهايتي الماصة باستخدام السبابة والابهام ويرج المزيج جيداً بالتحريك الخفيف للماصة ولمدة دقيقتين (ويجب أن لا تتم عملية الرج بعد ذلك لإحتمال تكسر كريات الدم في هذه الحالة) الى أن يتجانس المحلول تماماً. بعدها يتم التخلص من قطرتين أو ثلاث من الدم الواقعة اسفل عمود الماصة وذلك لعدم تجانس المحلول الموجود في ساق الماصة جيداً ولعدم توزع كريات الدم بصورة جيدة في هذه المنطقة. ضع قطرة من الدم المخفف عند حافة غطاء الشريحة بحيث تمسك الماصة بزاوية 45° مع الشريحة الموضوعة على المنضدة ويجب ملاحظة عدم تسرب المحلول حول غطاء الشريحة.

يلاحظ نزول القطرة بالخاصية الشعرية وتوزعها بصورة متجانسة تحت غطاء الشريحة ضع الشريحة على مسرح المجهر وانتظر لمدة دقيقتين الى أن تثبت الكريات الحمراء. افحص الشريحة باستخدام قوة التكبير الصغرى لمعرفة توزيع الكريات الحمراء الذي يجب أن يكون متجانساً تماماً وخالي من الكتل وإذا لوحظت أية كتل من الكريات أو الشك في عدم تجانس توزيع المحلول أو وجود فقاعات يتم تنظيف الشريحة وتجفيفها وإعادة العملية مرة أخرى بوضع قطرة جديدة من محلول الدم المخفف. أما إذا استمر وجود الكتل فيجب إعادة الخطوتين الأولى والثانية (أي تعاد عملية تخفيف الدم بأكملها). عند التأكد من عدم وجود أي من المعوقات أعلاه يتم فحص الشريحة تحت القوة الكبرى للمجهر. تجري عملية العد في خمسة مربعات متوسطة ضمن المربع المركزي ويتم عادة إختيار المربعات الواقعة في الزوايا الأربعة والمربع الوسطي. وبعد أن كل من هذه المربعات يحتوي على 16 مربع صغير فإن عملية العد تتم في 80 مربع صغير. ارسم مربعاً كبيراً مع مربعاته الخمسة التي أشرنا لها ثم دون في كل مربع العدد الذي ستحصل عليه. وعند العد تحسب الكريات الموجودة على الضلعين الأعلى والأيمن من المربع الصغير بالإضافة الى الكريات الموجودة داخل المربع طبعاً ولكن تهمل تلك الموجودة على الضلعين الأيسر والأسفل (لأنها تحسب ضمن المربعات المجاورة). تجمع النتائج المدونة في كل مربع متوسط ويراعى أن لا تكون الفروق بين مجموع المربعات الخمسة المتوسطة أكثر من 12% "زيادة أو نقصان" وألا يعتبر توزيع الكريات الحمراء غير متجانس. احسب عدد الكريات الحمراء في كل ملم³ من الدم.

الحسابات :

بما أن الدم محسوب حتى العلامة 0.5 ومخف حتى العلامة 101 فإن هو بنسبة 101/0.5 أي 202/1 وبما أن محلول التخفيف لم يمتزج مع الدم في ساق الماصة وبالتالي أهملنا القطرات الموجودة في هذه المنطقة حتى العلامة قبل وضع الدم للفحص، فإن التخفيف الحقيقي يصبح 200/1.

بما أن طول ضلع المربع الصغير هو 0.05 ملم فإن مساحته $0.05 \times 0.05 = 0.0025$ ملم² وبما أن العد قد تم في خمسة مربعات متوسطة كل منها يتكون من 16 مربع صغير، فإن المساحة التي تم فيها العد هي :

$$15 \times 16 \times (400/1) = 400/80 = 5/1 \text{ ملم}^2$$

بما أن عمق الحفرة في الشريحة هي 0.1 ملم، فإن حجم الدم الذي يتم فيه حصر الكريات $(5/1) \times (5/1) = 50/1$ ملم³

لو فرضنا أن عدد كريات الدم الحمراء التي تم حصرها في المربعات الخمسة هي n فهذا يعني أن n كرية حمراء موجودة في $50/1$ ملم³ من الدم المخفف وهذا يمثل حجم 80 مربع صغير.

∴ فإن عدد الخلايا في 1 مليمتري مكعب من الدم المخفف $50 \times n$

وبما أن الدم مخفف الى $200/1$ ، فإن مليمتري مكعب من الدم يحتوي على $200 \times 50 \times n = n \times 10.000$ كرية / مليمتري مكعب

أسباب الزيادة في عدد كريات الدم الحمراء:

نقص الأوكسجين – أمراض القلب وامراض تليف الرئتين ووجود بعض أنواع الهيموجلوبين غير الطبيعي.

أ- أخطاء تؤدي إلى زيادة العدد1.

حجم الدم اكثر من 20 ميكروليتر أو حجم المحلول اقل من الحجم المطلوب.

2. عدم مزج العينة جيدا مع محلول التخفيف.

3. توزيع كريات الدم الحمراء في شريحة العد غير متوازن.

4. مل خاطئ لشريحة العد.

5. عد جميع كريات الدم الحمراء الملامسة للخطوط الجانبية.

أسباب نقص كريات الدم الحمراء:

أمراض الدم مثل اللوكيميا وفشل نخاع العظمي الخ

ب- أخطاء تؤدي إلى نقص العدد:

1. حجم الدم اقل من 20 ميكروليتر أو حجم المحلول اكثر من الحجم المطلوب.

2. إرجاء العد لمدة طويلة.

3. وجود جلطة صغيرة في العينة.

4. وجود فراغات هوائية أو شوائب.

5. استعمال شريحة غير نظيفة.

المعدل الطبيعي:

الفئة النسبة – ملليمتر المكعب

الرجال 4.5 – 6.5 مليون / ملليمتر المكعب

النساء 3.8 – 5.8 مليون / ملليمتر المكعب

أطفال (3 شهور) 3.2 – 4.8 مليون / ملليمتر المكعب

أطفال (3 – 6 أعوام) 4.1 – 5.5 مليون / ملليمتر المكعب

أطفال (10 – 12 عام) 4 – 5.4 مليون / ملليمتر المكعب

نسبة الهيموجلوبين Hemoglobin

هو مقدار الهيموجلوبين في حجم الدم، الهيموجلوبين هو جزيء البروتين داخل خلايا الدم الحمراء التي تحمل الأوكسجين ويعطي الدم لونه الأحمر. المعدل الطبيعي له يختلف بين الجنسين حيث يكون ما يقرب من 13 إلى 18 جرام لكل ديسيلتر للرجال و 12 إلى 16 للنساء.

الهيماتوكريت (Hematocrit)

هو نسبة من حجم خلايا الدم الحمراء لحجم الدم كله و المعدل الطبيعي له يختلف بين الجنسين حيث يكون من 45% إلى 52% للرجال و 37% إلى 48% بالنسبة للنساء. وجود نقص في عدد الخلايا الحمراء أو نسبة الهيموجلوبين في الدم عن المعدل الطبيعي يشير إلى وجود أنيميا بينما وجود زيادة في هذه النسب عن المعدل الطبيعي قد يشير إلى وجود مشاكل في القلب أو الكبد بالإضافة إلى التدخين.

حجم الكرية الوسطي (MCV)

هو متوسط حجم خلية الدم الحمراء وهو القيمة المحسوبة المستمدة من الهيماتوكريت وعدد الخلايا الحمراء والمعدل الطبيعي له يقع بين 80 و 100 فيمتولتر (جزء من المليون ليتر).

كمية الهيموجلوبين الوسطي للكرية (MCH)

هو متوسط كمية الهيموجلوبين في خلايا الدم الحمراء وهو القيمة المحسوبة المستمدة من قياس الهيموجلوبين وعدد كريات الحمراء والمعدل الطبيعي له من 27 إلى 32 بيكوغرام.

تركيز الهيموجلوبين الوسطي للكرية (MCHC)

هو متوسط تركيز الهيموجلوبين في حجم معين من خلايا الدم الحمراء وهو الحجم المحسوب المستمد من قياس الهيموجلوبين والهيماتوكريت والمعدل الطبيعي هو 32% إلى 36%.

عرض التوزيع لخلايا الدم الحمراء (RDW)

هو قياس التغير في حجم وشكل الخلايا الحمراء والمعدل الطبيعي هو 11 إلى 15. يتم إجراؤه من أجل فحص تعداد الدم من خلال أخذ عينة وريدية من الدم وهو يعد من الفحوصات الروتينية التي تقيس كمية وصفات المجموعات الثلاث من خلايا الدم.

تم إجراء فحص (RDW) في حالات تقييم الإصابة بمرض الأنيميا (فقر الدم)، أو الزيادة أو النقص في عدد كريات الدم الحمراء خاصة والهيموغلوبين. كما يلجأ اليه الطبيب في حال الشك بوجود التهابات أو عدوى من خلال الزيادة في كريات الدم البيضاء. قد يكون في حالات مُصابة لفحوصات أخرى خاصة قياس التخثر بالدم (الصفائح الدموية) سواء بزيادتها أو نقصانها.

ويساعد هذا الفحص في الكشف عن حالات تقييم نقص المناعة المكتسبة عندما يكون هناك انخفاض في كريات الدم البيضاء وأنواعها، أو في حالة التشخيص للسرطانات مثل سرطان اللوكيميا أو السرطان الحاصل في الجهاز الليمفاوي. كما يُجرى تحليل (RDW) كفحص روتيني قبل القيام بالعمليات الجراحية.

عدد الصفائح الدموية Platelet count

عدد الصفائح الدموية في حجم معين من الدم وهي ليست خلايا كاملة ولكنها أجزاء من السيترولازم تصنع من خلايا وجدت في نخاع العظام تسمى النواء الصفائح الدموية تلعب دوراً حيوياً في تخثر الدم.

المعدل الطبيعي يختلف قليلاً بين المختبرات ولكنه في حدود 150.000 إلى 400.000 لكل مليمتير مكعب (x10⁹ 400-150) خلية لكل لتر. وجود زيادة في عدد الصفائح الدموية يشير إلى وجود مشكلة في نخاع العظم أو التهاب شديد بالإضافة إلى نقص الحديد بالدم بينما وجود نقص في العدد عن المعدل الطبيعي يشير لوجود نزيف لفترات طويلة.

خطوات ما قبل التحليل

من أجل نجاح التحليل والوصول الى نتائج دقيقة تساعد الطبيب بالكشف عن حالة الجسم، ينبغي اتباع بعض الخطوات؛ وهي على الشكل التالي:

- الصيام ما لا يقل عن 8 الى 12 ساعة.
- في حال كان المريض يتناول نوعاً ما من الادوية في الصباح، يجب تأجيل تناوله الى ما بعد أخذ عينة من الدم.
- إذا كانت المرأة ضمن أيام الدورة الشهرية عليها إعلام اختصاصي المختبر بذلك.
- الامتناع عن تناول الفيتامينات والمكملات الغذائية قبل 48 ساعة من الموعد الذي سيتم فيها إجراء الفحص الطبي الشامل، عدا ما يحدده الطبيب.

عوامل تؤثر على نتيجة التحليل

هناك بعض العوامل التي قد تؤثر على صحة النتيجة فتكون غير دقيقة؛ لذلك يتوجب على كل مريض ان يعلم طبيبه او اختصاصي سحب الدم في حال تناوله أي نوع من الادوية او في حال كان لديه أي مرض مزمن او حساسية وغيرها.

ومن العوامل التي تؤثر على نتيجة التحليل:

- تناول بعض الأدوية التي تسبب انخفاض نسبة الصفائح بالدم مثل الكورتيزون، بعض المضادات الحيوية ومدرات البول والعلاج الكيماوي.
- ارتفاع نسبة الدهون الثلاثية بالدم أو وجود زيادة كبيرة في معدل كريات الدم البيضاء قد يسبب ارتفاعاً خاطئاً في نسبة الهيموجلوبين بالدم.
- وجود تضخم بالطحال قد يسبب نقص في نسبة الصفائح الدموية أو كريات الدم البيضاء بالدم.
- الحمل طبيعياً يؤدي إلى انخفاض عدد كريات الدم الحمراء وارتفاع عدد كريات الدم البيضاء.
- بقاء الرباط المرن ضاعطاً لفترات طويلة على الوريد وعدم إزالته قبل سحب العينة.

ملاحظة جميع التحاليل اعلاه يمكن اجرائها بجهاز CBC

1 -تقدير نسبه الهيموجلوبين في الدم

أ- طريقة جهاز ساهلي:

يوجد الهيموكلوبين في كريات الدم الحمراء واليه يعزى اللون الأحمر لهذه الكريات وهو عبارة عن جزئين أحدهما بروتيني وهو الكلوبين Globin والجزء الآخر يحتوي على الحديد ويعرف بالهيم Haem الذي يتكون من نواة البورفيرين التي هي أساساً أربع حلقات من البيرول Pyrole مرتبطة مع بعضها البعض بأربع مجاميع من الميثين ولذلك تدعى البورفيرينات برباعيات البايرول tetrapyrole والحديد الموجود في الهيم يكون على شكل حديدوز Fe^{++} ويتصل الحديد بذرة النتروجين في كل حلقة بيرول وكذلك يتصل بذرة النتروجين في مجموعة الايمينازول Iminazole في بروتين الكلوبين ويتضح أدناه تركيب جزيئة الهيم.

تختلف نسبة الهيموكلوبين في دم اللبائن إذ تتراوح من 15-16 غم / سم³ من الدم وتعتمد هذه النسبة على عمر الحيوان وجنسه (في الرجل البالغ الطبيعي يصل تركيز الهيموكلوبين الى 15.8 غم/ 100 سم³ بينما في المرأة البالغة يصل الى 13.7 غم/ 100 سم³ — عند الولادة يرتفع تركيز الهيموكلوبين الى 23 غم/ 100 سم³ وبعد ثلاثة أشهر يقل الى 12.5 غم/ 100 سم³ ويصل في نهاية السنة الأولى بعد الولادة الى 12.5 غم/ 100 سم³. كما تختلف نسبته باختلاف فصول السنة ومدى الإصابة بالأمراض. وللهموكلوبين دور مهم في تبادل الغازات ونقلها إذ يكون مركب غير ثابت مع الأوكسجين وثاني أوكسيد الكربون.

تقدر كمية الهيموكلوبين بطرق مختلفة مثل قياس اللون أو مدى إتحاده مع الأوكسجين أو أول أوكسيد الكربون أو بمحتواه من الحديد والطريقة شائعة الإستعمال عادة هي طريقة



سالي Sahli ويدعى الجهاز المستخدم لقياس الهيموكلوبين في هذه الطريقة باسم haemometer والطريقة تدعى Acid haematin method.

صورة (3-6) جهاز ساهلي

وصف جهاز تقدير الهيموكلوبين (Haemometer) (Haemoglobinometer)

يتكون هذا الجهاز كما موضح في الشكل التالي من ثلاثة أنابيب متساوية القطر موضوعة في حامل جداره الخلفي يتكون من زجاج شفاف والأنبوبة الوسطية تكون فارغة عادة ومخصصة لوضع الدم المراد فحصه وتحتوي على تدريجين احدهما يعطي تركيز الهيموكلوبين مقدراً بالغرامات لكل 100 سم³ من الدم بينما يعطي التدريج الثاني النسبة المئوية للهيموكلوبين. أما الانبوتان الاخرتان تكون عادة مملوءة بالمحلول القياسي (هماتين حامضي (Acid haematin) وملحق مع الجهاز ماصة شعرية دقيقة micropipette حجمها 20 مايكرو لتر وانبوب زجاجي صلد لتحريك المحلول (عينة الدم في حامض الهيدروكلوريك) وقطرة وفرشاة لتنظيف الانبوبة الوسطية.

طريقة العمل :

1- تأكد من أن الجهاز نظيف وجاف.

2- يضاف حامض الهيدروكلوريك (HCl) 1N،0 الى حد العلامة 20 في الانبوبة الوسطية.

3- تسحب عينة من الدم المراد فحصه باستخدام الماصة حتى العلامة 20 لا توجد أية فقاعة ثم تضاف الى الحامض (توضع نهاية الماصة في قعر الانبوبة) ثم تغسل الماصة عدة مرات في المحلول قبل اخراجها لكي تضمن عدم وجود دم عالق بجدار الماصة.

4- حرك محتويات الانبوبة باستخدام القضيب الزجاجي لكي يتحول جميع الهيموكلوبين الى هيماتين حامضي بني اللون.

5- أضف ماء مقطر وبمعدل قطرة واحدة كل مرة الى أن تحصل على لون مماثل للون المحلول في الانبوتتين القياسيتين، ثم اقرأ النتيجة بعد عشر دقائق والتي تعطيك النسبة المئوية للهيموكلوبين مقارنة بالمحتوى القياسي.

من الممكن حساب دليل اللون (C.I) Colour index الذي يمثل متوسط كمية الهيموكلوبين في كرية دم حمراء واحدة باستعمال المعادلة التالية :

$$\frac{\text{النسبة المئوية للمنتج} + \text{CuSO}_4 + \text{NaOH}}{\text{الهيموكلوبين}} = (\text{C.I.})$$

النسبة المئوية لكريات الدم الحمراء

ب- تقدير الهيموجلوبين بطريقة الدرابكين Drabkin Method :

تقدر كمية الهيموجلوبين بقياس اللون الناتج عن اتحاده بالسيانيد بجهاز قياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) ويجب ان يكون لون محلول التخفيف اصفر باهتا رائقا يعطي درجة امتصاص صفر عند قراءته علي جهاز القياس الطيفي عند طول موجي 540 نانوميتر باستعمال الماء المقطر (Blank) تنتج الشركات كاشف لتقدير الهيموجلوبين بطريقة السيانيد يتم تخفيفه باتباع إرشادات الشركة المنتجة.

يحفظ محلول التخفيف في زجاجة بنية اللون لعدة شهور في درجة حرارة الغرفة.

طريقة العمل:

1. يوضع 5 مل محلول درا بكين + 20 ميكروليتر (20ul) دم باستخدام ماصة أوتوماتيكية (أو ماصة الهيموجلوبين).

2. ترج الأنبوبة تم تترك لمدة 3 – 5 دقائق حتي يتم التفاعل.

3. يقرأ علي طول موجي 540 نانوميتر بعد ضبط صفر الجهاز باستخدام محلول درابكين.

4. تقرأ عينة قياسية (Standard) علي الجهاز الحساب : درجة امتصاص الاختبار X تركيز المحلول القياسي X معامل التخفيف

درجة امتصاص القياسي 100 = تركيز الهيموجلوبين - بالغرام / 100 مليلتر.

ملحوظة: هناك بعض الكواشف يمكن قراءة نسبة الهيموجلوبين من جدول مرفق بالكاشف أو بعملية حسابية بسيطة وذلك في حالة عدم وجود المحلول القياسي.

طريقة أعداد منحني قياسي وجدول قياسي:

تعمل تخفيفات متتالية من المحلول القياسي Standard المعروف درجة تركيزه كآلاتي :- 2:1 و 3:1 و 4:1 و 5:1 وتقرأ هذه التخفيفات بعد ضبط صفر الجهاز بمحلول درابكين.

يرسم منحني بياني تقدير الهيموجلوبين بالغرام / لتر في كل قراءة ومنه يمكن عمل جدول قياسي لكافة القراءات وينصح بقياس المحلول القياسي عند تغيير الكاشف أو اجراء صيانة للجهاز.

المعدل الطبيعي:

الفئة النسبة بالغرام

الرجال 13 – 18 غم%

السيدات 11.5 – 16.5 غم%

أطفال (حديث الولادة) 16.5 – 19.5 غم%

أطفال (ثلاثة شهور) 9.5 – 13.5 غم%

أطفال السنة الأولى 1.05 – 13.5 غم%

أطفال السنة الأولى 1.05 – 13.5 غم%

أطفال 3 – 6 سنوات 12 – 14 غم%

أطفال 10 – 12 سنة 11.5 - 14.5 غم%

سيدات حوامل لا يقل عن 11 غم%

تحليل حساب عدد الصفيحات الدموية بشكل يدوي Platelets Count Test

لا توجد طريقة مثالية في هذا الاختبار نظرا لسهولة تجمع الصفائح الدموية وصغر حجمها لذا يجب أن تكون الأدوات المستعملة نظيفة والمحاليل المستعملة تكون معقمة وترشح دائما وتوضع في الثلاجة في حالة عدم الاستعمال ويجب التأكد من خلوها من الشوائب .

– وهناك طريقتين للاختبار :

1. مباشرة . Direct

2. غير مباشرة . Indirect

1. الطريقة المباشرة :

* طريقة الفورمالين سيترات : Formalin Citrate يحضر محلول الفورمالين سيترات كالآتي :

32 gm sodium citrate in 1 liter dist water + 10 ml formalin

32 جرام من سترات الصوديوم في لتر من الماء + 10 مللى فورمالين

الطريقة :

1. يوضع في أنبوبة و ازمان 2 سم من محلول الفورمالين سترات .
2. يسحب الدم من الماصة حتى العلامة 2.
3. توضع في المحلول وتخلط جيدا .
4. تؤخذ نقطة بواسطة قطارة وتوضع على شريحة العد .
5. يعد في مربعات العد الأحمر ويضرب في 1000.

* طريقة اوكسالات الألومنيوم :

1جم من اوكسالات الامونيوم في 100 مللى ماء مقطر ويحفظ بالثلاجة ويرشح قبل الاستعمال .

الطريقة :

1. يؤخذ الدم على مانع تجلط EDTA .
2. يؤخذ الدم بالماصة الخاصة ب كرات الدم الحمراء حتى العلامة ويكمل حتى العلامة 100 باوكسالات الامونيوم وتخلط محتويات الماصة .
3. نضع على شريحة نظيفة الـ Cover ونضع عليها جزء من محتويات الماصة .
4. نضع الشريحة في Petri-Dish يحتوى على قطن مبلل وورقة ترشيح مبللة ويغطى الطبق وتترك لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة من 15 – 25 درجة سيليزية .
5. نضع شريحة العد تحت الميكروسكوب وتعد الصفائح الدموية بالطريقة المتبعة في عد الدم الأحمر وتجمع المربعات وتضرب النتائج في 5000 .

2- الطريقة غير المباشرة :

عد الصفائح الدموية بطريقة الفيلم المصبوغ بنفس صبغة الـ Reticulocytes مع اختلاف في عد الصفائح للمريض يجب أتباع الآتي :

1. عد دم احمر على الهيموستيوميتتر للمريض .
2. نضع نقطة من زيت السيدار على الجزء المتجانس من الفيلم المصبوغ (اي الجزء الدقيق) .
3. نعد كرات الدم الحمراء الموجودة في الفيلم مع عد الصفائح .
4. نبدأ العد إلى أن يصل عد كرات الدم الحمراء 1000 كرة ونرى عدد الصفائح في هذا العدد .

طريقة الحساب :

عدد الصفائح = (عدد الصفائح في الفيلم المصبوغ / عدد الكرات الحمراء في الفيلم المصبوغ) X عدد كريات الدم الحمراء للمريض

القيم الطبيعية: 150000 – 450000

تحليل ESR وطريقة العمل

تعريف : تحليل ESR وهو اختصار لكلمة Erythrocyte Sedimentation Rate أو ما يسمى سرعة ترسيب كريات الدم الحمراء ويعرف التحليل على أنه المسافة التي تترسب بها كريات الدم الحمراء بعد ترك الدم المأخذ على أنبوب يحتوي على مانع تجلط في وضع عمودي .

وتعتمد سرعة الترسيب على فرق قوة الجاذبية بين الكريات الحمراء و البلازما ، فالقوة الجاذبية للكريات الحمراء تساوي 1.1 و البلازما تساوي 1.055 وبسبب ارتفاع القوة الجاذبية عند الكريات الحمراء عن البلازما يجعلها تترسب إذا كانت في وضع عمودي.

مبدأ اختبار سرعة ترسيب الكريات الحمراء : ESR

سرعة ترسب كريات الدم الحمراء تقاس بالمليمتر التي تقطعها الكريات الحمراء الموجودة في أنبوب نوعي خاص خلال ساعة واحدة من الزمن و باستخدام مانع التجلط سترات الصوديوم بتركيز محدود ، هذه المسافة المقطوعة سوف تعكس السرعة التي تترسب بها هذه الكريات الحمراء تحت تأثير الجاذبية الأرضية .

أن هذه السرعة متعلقة حتماً بجميع الصفات الشكلية و العددية للكريات الحمراء ، كما أنها مرتبطة وبشكل أساسي بصفات و نوعية و كمية بروتينات البلازما ، هذه الصفات المذكورة جميعها هي التي تحدد درجة لزوجة الدم و بالتالي فإن أي تغيير يطرأ عليها

خلال الحالات المرضية فإنه يزيد أو ينقص درجة اللزوجة وبالتالي يزيد أو ينقص سرعة ترسي الكريات الحمراء .

المعدل الطبيعي :-

- للذكور من 0 حتى 13 ملم بعد ساعة .
- للإناث من 0 حتى 20 ملم بعد ساعة .
- الأطفال من 7 حتى 11 ملم بعد ساعة .

أهمية معرفة معدل ترسي الكريات الحمراء : ESR

هو اختبار غير نوعي Non Specific ولا يشير إلى مرض معين و محدد لذلك يستعمل كاختبار مساعد لاكتشاف بعض الأمراض و تكمن أهمية بالآتي :

- يستعمل العلاج لمعرفة مدى تأثير علاج معين و تقدم الحالة المرضية .
- يشير في حالة القيمة الغير طبيعية إلى حده وقوة المرض فكلما كانت النتيجة بعيدة عن الطبيعي كلما زادت حدة المرض .
- يستعمل كتشخيص للدلالة على نشاط بعض الأمراض مثل التدرن الرئوي .
- للتفريق بين الأورام الخبيثة و الحميدة .
- يستعمل بشكل روتيني لتقصي وجود مرض من عدمه في بعض الأمراض .

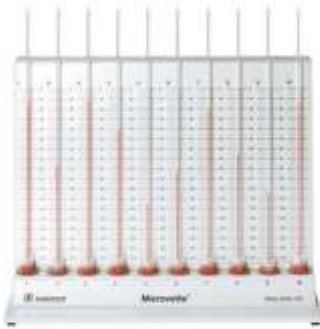
الأهمية الطبية :

- تزداد سرعة ترسي الكريات الحمراء فسيولوجياً و مرضياً في الآتي :

1. تزداد فسيولوجياً في الحمل و الدورة الشهرية وتقدم العمر .
2. تزداد مرضياً في فقر الدم و خاصة الحاد و سرطان الدم و الروماتيزم و الأورام الخبيثة وخاصة اللمفوما و السل الرئوي و الكسور و التسمم و الالتهابات بشكل عام و غيرها من الأمراض .

- تقل سرعة ترسيب الكريات الحمراء فسيولوجياً و مرضياً في الآتي :

1. تقل فسيولوجياً عند حديثي الولادة .
2. تقل مرضياً في فقر الدم بزيادة الكريات الحمراء (احمرار الدم) وفقر الدم المنجلي و الأشكال الغير



طبيعية للكريات الحمراء و الحروق و الجفاف و هبوط القلب و الحساسية .

طريقة عمل اختبار سرعة ترسيب الكريات الحمراء : ESR الطريقة الشائعة لعمل اختبار الـ ESR تسمى طريقة ويستيرجين Westergren ويستخدم لها ممص خاص طولة 300 ملم و مدرج من الصفر وحتى 200 ملم .

1. توضع عينة الدم في أنبوب خاص و التي تحتوي على مانع التجلط (سترات الصوديوم) لذلك يجب أن تمزج العينة جيداً مع مانع التجلط .

2. يتم إدخال ماصة ويستيرجين في فتحة الأنبوب المحتوي على عينة الدم مع الضغط على الماصة حتى يصل مستوى الدم إلى الصفر وتوضع الماصة بشكل عمودي بواسطة حامل خاص .

3. يسجل معدل الترسيب بعد ساعة واحدة من وضع الماصة بالأنبوب .

❖ الآن يتوفر جهاز باسم فس مائك
VES-MATIC 20 الذي يقيس المعدل
لعشرين عينة دم دفعة واحدة و يستغرق
وقت أقل من طريقة ويستيرجين .
صورة (3-7) أجهزة طريقة ويستيرجين



Widal test اختبار السالمونيلا (اختبار فيدال)

اختبار السالمونيلا (اختبار فيدال) Salmonella Test (Widal Test)

نبذة عن بكتيريا السالمونيلا Summary of Salmonella

بكتيريا عصوية الشكل Short Bacilli ، سالبة لصبغة كرام Gram negative ، متحركة Motile ، لا تكون كبسولة Non-capsulated . لبكتيريا السالمونيلا أكثر من 1400 نوع مصلي Serotypes بعضها يسبب أمراضاً للإنسان . لبكتيريا السالمونيلا عدة أجناس أهمها طبيياً S. Typhi و S. Paratyphi والتي تسبب الحمى معوية Enteric Fever وأنواع S. Typhimurium و S. Enteritidis التي تسبب تسمم غذائي Food Poisoning والتهاب القولون Enterocolitis ونوع S. Choleraesuis الذي يسبب التسمم للدم Septicemia .

الخصائص المصلية Serological characters

تحتوي بكتيريا السالمونيلا على ثلاث أنواع من الأنتيجين Antigens وهما جسم البكتيريا Somatic الذي يرمز له بـ O antigen وعلى السوط Flagella ويرمز له بـ H antigen والكبسولة Capsulate ويرمز لها بـ K antigen.

تقاوم هذه البكتيريا الممرضة المناعة الطبيعية بجسم الإنسان وذلك بمنعها للبلعمة والإلتهاام وكذلك بإفراز سم داخلي Endotoxin وقد تفرز سم خارجي Exotoxin .

مبدأ الاختبار المصلي

الاختبار يجرى بطريقة اللاتكس Latex Method وهي طريقة حساسة إلى حد كبير إذا تم إجراء الاختبار تحت الظروف المناسبة ويتم التراص بالطريقة المباشرة Direct Agglutination .

ومبدأ الاختبار هو إضافة الأنتيجينات Reagent بعد معاملتها صناعياً إلى الأجسام المضادة في مصل المريض سيحدث تراص Agglutination واضح بالعين المجردة.

طريقة التراص في الأنابيب أفضل من طريقة التراص على شريحة اللاتكس لكن سهولة وسرعة إجراء اللاتكس (الشريحة) وأيضاً قلة التكلفة جعلته هو السائد عند الكثير من البلدان التي يستوطن فيها هذا المرض.

• اختبار فيدال Widal Test

في هذا الاختبار يتم البحث عن الأجسام المضادة الخاصة بالسالمونيلا من نوع IgG و IgM في مصل Serum المريض، ويتميز هذا الاختبار بسهولة عمله وحساسيته إذا تم عمل الاختبار بطريقة التخفيف Dilution ، واختبار فيدال هو للأنواع S. Typhi و S. Paratyphi فقط أم بقية الأنواع فمن الأفضل الكشف عنها بطريقة الزراعة في معمل المايكروبيولوجي ، وكما ذكرت سابقاً فإن الاختبار يبحث عن الأجسام المضادة المتكونة من دخول الأنتيجينات لجسم المصاب وأهم هذه الأنتيجينات (O antigen) جسم البكتيريا Somatic و (H antigen) سوط البكتيريا Flagella، لهذه الأنتيجينات عدة أنواع مهماً طبياً لذلك لابد من الكشف عنها باختبار فيدال وهي:

لـ (O antigen) أربعة أنواع هي OA و OB و OC و OD لـ (H antigen) أربعة أنواع هي HA و HB و HC و HD .

طريقة عمل اختبار Widal Test procedure.

تحضر جميع المحاليل Reagents وعينات المرضى (مصل Serum) على درجة حرارة الغرفة.

2. يوضع 20 ميكروليتر من Positive control في الحجرة الأولى Well على شريحة اللاتكس ميكروليتر من Negative control في الحجرة الثانية وذلك من أجل

المقارنة بعد خروج نتائج الاختبار مع الكنترول والتأكد من أن المحاليل Reagents سليمة وصالحة للاستخدام.

3. يستخدم 8 حبرات لكل عينة (يوجد 8 أنواع من الأنثجين) وذلك بوضع 20 ميكروليتر من المصل Serum في كل حبرة Well .

4. تمزج محاليل اللاتكس المحتوية على الأنثجينات لكل أنواع السالمونيلا الثمانية بالتقليب ثم تؤخذ 40 ميكروليتر قطرة واحدة (Drop) منه إلى كل حبرة المحتوية على مصل المريض.

5. تمزج Mix بشكل دائري باستخدام الأعواد المناسبة.

6. توضع شريحة اللاتكس على الهزاز Shaker لمدة 1-3 دقائق يظهر التراص تحت ضوء مناسب ولا تؤخذ نتيجة بعد هذا الوقت لأن بدء جفاف العينة قد يؤدي إلى ظهور ايجابية كاذبة. Positive False.

• (+) : حدوث تراص (Agglutination (Ab-Ag Reaction)

• (-) : عدم حدوث تراص (Non Agglutination (Ab-Ag Non Reaction)

• في حالة حدوث تراص Agglutination لابد من عمل التخفيف للعينة Dilution of Sample :

• يفضل عمل التخفيف في أنابيب Tubes ويوضع في كل أنبوب 100 ميكروليتر من الـ Normal Saline ويوضع في الأنبوب الأول 100 ميكروليتر من عينة المصل Serum وتمزج وينقل إلى الأنبوب الثاني 100 ميكروليتر وهكذا إلى آخر أنبوب في أنابيب التخفيف بعد ذلك ينقل من كل أنبوب 100 ميكروليتر إلى الحبرات في شريحة اللاتكس ويضاف المحلول Reagents على كل الحبرات Wells. يتم تسجيل آخر تخفيف ظهر فيه التفاعل إيجابي (+) كنتيجة نهائية للاختبار (قد تختلف مقدار وطريقة التخفيف من شركة مصنعة لأخرى).

اختبار الكشف عن الخلايا المنجلية (Sickle Cells Test)

يحدد هذا الاختبار وجود فقر الدم المنجلي أو عدمه ، وفقر الدم المنجلي حالة من حالات فقر الدم ، والتي تظهر فيها كريات الدم الحمراء على شكل المنجل.

وذلك نظراً لوجود كمية من الهيمو جلوبيين الغير طبيعي التي تؤدي إلى ترسيبه على شكل الكريستال في حالة نقص الأكسجين في الدم مما يعطي كريات الدم الحمراء شكل المنجل

توجد طريقتان للكشف عن الخلايا المنجلية بالمختبر :

الطريقة الأولى استخدام محلول Sickling solution – (Solubility Method)1

طريقة العمل:

1. يوضع 2 ملم من محلول الـ Sickling solution في انبوبة اختبار نظيفة.
2. يوضع 25 ميكروليتر من عينة الدم ببطء على المحلول السابق.
3. تُحرك الانبوبة برفق شديد حتى تمتزج كمية الدم بالمحلول.
4. تترك الانبوبة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة ' ثم تقرأ النتيجة بعد ذلك.

* كيفية قراءة النتيجة :

- عند وجود عكارة في الانبوبة بحيث إذا وضع خطين باللون الاسود كخلفية للانبوبة لايمكن رؤيتها بوضوح تعتبر النتيجة إيجابية.
- أما إذا كانت الانبوبة صافية أو راتقة ويمكن رؤية الخطوط تعتبر النتيجة سلبية.

* شرح تأثير المحلول:

يعمل محلول الـ (Sickling solution) على تكسير كريات الدم الحمراء وبالتالي في وجود الهيموجلوبين (S) يصبح المحلول معكر نظراً لأن هذا النوع من الهيموجلوبين لايزوب في المحلول (Sickling solution) أما في حالة وجود هيموجلوبين طبيعي فإنه يذوب في المحلول وتصبح الأنبوبة صافية.

❖ الطريقة الثانية استخدام الشريحة الزجاجية:

* طريقة العمل:

- 1- توضع قطرة من الدم في منتصف شريحة زجاجية نظيفة.
- 2- يوضع عليها غطاء الشريحة (Cover glass) بطريقة تمنع من تكون فقاعات الهواء تحت الغطاء .
- (في حالة تكون فقاعات هوائية يمكن الضغط على الغطاء حتى خروج الفقاعات).
- 3- يتم وضع (الفازلين أو الشمع أو الكندا بلسم) على حواف الـ (Cover glass) حتى لايتسرب الهواء إلى الداخل.
- 4- تترك الشريحة الزجاجية في الحضانة عند 37 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة.
- 5- تفحص الشريحة بعد التحضين بواسطة الميكروسكوب تحت العدسة الزيتية.

* كيفية قراءة النتيجة:

- في حالة الإيجابية تأخذ كرات الدم الحمراء شكل المنجل.
- في حالة السلبية لايتغير شكل كريات الدم الحمراء وتبقى كما هي.

* شرح ما يحدث في هذه الطريقة :

يمنع الـ (Cover glass) مع وجود الشمع على الحواف الخارجية له من دخول الأكسجين إلى الداخل كما ان زيادة فترة التحضين لمدة 24 ساعة تؤدي إلى استهلاك الأكسجين الموجود تحت غطاء الشريحة الـ (Cover glass) وبالتالي في حالة وجود كريات الدم الحمراء المنجلية فإنه يحدث ترسيب للهيموجلوبين بداخلها نتيجة للنقص الحاصل في الأكسجين مما يعطيها شكل المنجل.

أما في حالة وجود كريات الدم الحمراء الطبيعية فإنه لا يحدث تغير في شكلها عند نقص الأكسجين.

يتم إضافة محلول الـ (Sodium dithionite) إلى قطرة الدم فيساعد هذا المحلول على سحب الأكسجين من الدم وبالتالي يؤدي ذلك إلى اخذ كريات الدم الحمراء الشكل المنجلي في فترة وجيزة ، ويمكن في هذه الحالة قراءة نتيجة الاختبار خلال ساعة من الزمن.

تقنية الاليزا (ELISA) Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

تعد تقنية ELISA من تقنيات المختبرية التشخيصية الواسعة الاستخدام في معظم مختبرات التحليلات المرضية و خاصة في تشخيص الفايروسات وذلك للأسباب التالية:

تحليل عدد كبير من العينات.

تستغرق وقت قليل نسبيا.

الحساسية (Sensitivity) العالية، حيث تبلغ 99%.

مبدأ عمل تقنية ELISA

تستند هذه التقنية على مبدأ (EIAK) Enzyme immunoassay ، في هذه التقنية تثبت الاضداد او المستضدات في حفر صفيحة بلاستيكية تدعى Micro titer plate. توضع عينات مصل المرضى وعينات السيطرة في حفر الـ Micro titer plate فيحدث ارتباط بين الاضداد و المستضدات و بعد ساعة من الحضانة في درجة حرارة الغرفة ، تغسل الصفيحة بواسطة محلول غسل خاص لازالة المواد غير المرتبطة ، بعد ذلك يضاف انزيم مرتبط بجزيئة الضد Enzyme Conjugate و يحضن لمدة نصف ساعة. وبعد خطة غسل اخرى يتم اضافة المادة الاساس Substrate وتحضن الصفيحة لمدة 20 دقيقة ، حيث يظهر لون (أزرق عادة حسب نوع الكت المستخدم والشركة المصنعة) في الحفر. ثم يضاف بعد ذلك محلول Stop Solution حيث يتغير اللون من الازرق الى الاصفر. تقاس شدة اللون باستخدام جهاز الاليزا بطول موجي 450 nm. يتناسب تركيز الضد او المستضد المراد قياسه مع شدة اللون تناسباً طردياً.

أنواع تحليل الإليزا :

هنالك نوعان رئيسان لتحليل الإليزا، وفيما يأتي شرح لكل منهما :

تحليل الإليزا المباشر Direct ELISA: وفي هذا النوع يتم قياس نسبة وجود المستضد في عينة الدم ؛ وهو مُسبّب المرض (نسبة انتيجين مجهول في العينة - اي الميكروب نفسه) ، فيكون طبق الإليزا مطلبياً بالأجسام المضادة التي ترتبط بالمستضد في حال وجوده والكشف عنه.

تحليل الإليزا غير المباشر InDirect ELISA : يعمل على قياس وجود الأجسام المضادة التي ينتجها الجسم نتيجة دفاعه ضد المستضد (مضادات الميكروب) ، حيث يعمل عكس طريقة الإليزا المباشرة، فالطبق يحتوي على المستضد ليكشف عن وجود أجسام مضادة في العينة المأخوذة من المريض أو عدمها.

المواد المطلوبة

Microtiter strips: تحتوي على الضد او المستضد مثبت في الحفر (ألواح من البوليسترين مكونة من 96 قطعة، ومغلّفة إما بمستضد غير نشط أو جسم مضاد).

1. محاليل السيطرة القياسية Standards: وتتضمن:

• Negative control

• Cut-off standard

• Weakly positive control

• Positive control

2. **Enzyme conjugate:** يحتوي على اعداد مرتبطة مع انزيم Peroxidase (عبارة عن إنزيم مرتبط بأجسام مضادة تتفاعل بطريقة خاصة مع العينة) .

3. **TMB substrate solution:** تحتوي على مادة (TMB) (Tetramethylbenzidine).

4. **TMB stop solution:** ويحتوي على حامض الكبريتيك (H_2SO_4).

5. **Sample diluents:** محلول التخفيف : ويحتوي على Phosphate + buffer saline (potassium tetraiodomercurate 0.01%).

6. **Wash buffer:** محلول الغسل : ويحتوي على Phosphate buffer saline.

7. **Automatic pipette.**

8. ماء مقطر.

9. جهاز مطياف خاص Microtiter spectrophotometer أو (ELISA reader) ويجب أن تحتوي على مرشح يغطي ما بين 450-650 نانومتر.

10. جهاز غسل Microtiter ELISA washer. قد يكون نظام الغسيل نظاماً يدوياً ؛ يغسل صفّاً أو عموداً واحداً في نفس الوقت ، أو نظاماً شبه آلي ؛ يغسل شريطاً أو لوحة واحدة في وقت واحد، أو أنظمة آلية بالكامل ؛ يمكنها غسل ألواح متعددة (حسب نوع جهاز الاليزا) .

طريقة العمل:

1. يخفف مصل المرضى 1:100 بواسطة محلول التخفيف
2. يخفف محلول الغسل بالماء المقطر 1:10
3. توضع العينات و عينات السيطرة في حفر الـ Micro titer plate
4. تغلف الـ Micro titer plate بغطاء بلاستيكي و تحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 60 دقيقة ، تكون جدران الويلات مغطاة بالاجسام المضادة الخاصة بالانتيجين المراد الكشف عن وجوده عند اضافة العينة الى الويل تقوم الاجسام المضادة الموجودة على جدران الويل بالارتباط بالانتيجين اذا وجد في العينة.
5. تغسل الصفيحة بمحلول الغسل ، يتم غسيل الويل للتخلص من الاجسام المضادة غير المرتبطة والانتيجينات الاخرى الغريبة و يتبقى الانتجين المطلوب مرتبط بالجسم المضاد الوجود على جدار الويل يسمى الجسم المضاد المرتبط بالانتجين معقد الانيجين والجسم المضاد (antibody antigen complex).
6. يضاف محلول Enzyme conjugate لكل حفرة (جسم مضاد آخر يكون مميز او معلم بواسطة انزيم يتفاعل هذا الجسم المضاد الثاني مع معقد الانتجين والجسم المضاد).
7. تحضن الصفيحة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
8. تغسل الصفيحة.
9. يضاف محلول TMB substrate لكل حفرة. يقوم الانزيم المرتبط في الجسم المضاد الثاني بتحويله من مادة عديمة اللون الى لون.
10. تحضن الصفيحة لمدة 20 دقيقة.
11. يوقف التفاعل باضافة محلول TMB stop solution لكل حفرة.
12. يتم القراءة على جهاز الاليزا عند الطول الموجي المناسب (حسب نوع الكت المستخدم) تتناسب قوة امتصاص هذا اللون مع تركيز الانيجين المجهول في

العينة ويأتى مع كل كيت اليزا عادة (عدة استاندرات- محاليل قياسية) (6 غالبا) بتركيزا متدرجة معلومة يتم عمله مع الاختبار المطلوب ثم يتم رسم منحني قياسي يمثل العلاقة بين قوة التركيز concentration الامتصاص absorbance ويتم حساب النتائج من هذا المنحني.

التقييم الكمي : Quantitative evaluation

للقيام بالتقييم الكمي للأضداد او المستضدات الخاصة بالفايروس المطلوب يتم عمل منحني قياسي بين قيمة الكثافة الضوئية (O.D.) و تراكيز محاليل السيطرة القياسية، ومن خلال هذا المنحني يتم استخراج معادلة المنحني القياسي. وبذلك يمكن قياس تركيز الضد او المستضد اعتمادا على الكثافة الضوئية المقاسة بالمطياف.

التقييم النوعي : Qualitative evaluation

لاجل التقييم النوعي يتم قياس الكثافة الضوئية لمصل المرضى و يقارن بقيمة الكثافة الضوئية لـ Cut-off standard . اذا كانت قيمة الكثافة الضوئية للعينة اعلى من قيمة cut-off تعتبر العينة موجبة. اما اذا كانت قيمة الكثافة الضوئية للعينة اقل من الـ cut-off فتعتبر العينة سالبة.

جهاز التحليل الطيفي: Spectrophotometer

يستخدم هذا الجهاز في تحليل المواد الكيميائية اي حساب تركيز المركبات داخل العينات وهذا يعتمد على امتصاص جزيئات المركب للضوء ونسبة الضوء الداخل للعينة والضوء الخارج يحدد الامتصاصية للضوء.

يسلك الضوء المرئي سلوك الضوء فوق البنفسجي في كثير من مظاهره حيث أن كلاهما ينتج عن إمتصاصية إثارة إلكترونية في الجزيئات . كما أن أغلب الأجهزة التي تستخدم في طرق التحليل الطيفي في مجال الأشعة المرئية هي نفسها التي تستخدم في طرق التحليل الطيفي في مجال الأشعة فوق البنفسجية . لذا فقد جرت العادة على دراستهما معاً . ويغطي هذان الطيفان المجال من 200 إلى 800 نانو متر (ميلي ميكرون).

مطيافية فوق البنفسجية والمرئية UV and Visible Spectroscopy

المطيافية الإلكترونية هي أحد أنواع الدراسات الطيفية والتي تعتمد على إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية أو المرئية ، ولقد سميت بهذا الاسم لأن إمتصاص الأشعة في هاتين المنطقتين يؤدي إلى إثارة الإلكترونات في الجزيء الذي يمتص تلك الأشعة.

الأطياف الإلكترونية: Electronic Spectra

الطيف الإلكتروني لمركب ما عبارة عن منحني يوضح تغير شدة الإمتصاص (الإمتصاصية) مع تغير طول موجة الأشعة المارة في محلول المركب تحت الدراسة . ويهمننا من هذا المنحني معرفة طول الموجة التي تكون عندها شدة الإمتصاص أكبر مايمكن ويرمز لها بالرمز λ_{max} وكذلك معامل الإمتصاص المولي ϵ عند هذه الموجة

. وترتبط شدة الإمتصاص (A) بتركيز المحلول (C) وطول الخلية (L) بالمعادلة التالية:

$$A = \epsilon cl$$

وتعرف هذه المعادلة أحياناً بإسم قانون لامبرت- بير ومنها يتضح أن شدة الإمتصاص للمركب (أو إمتصاصية المركب) تتناسب تناسباً طردياً مع كل من التركيز المولي (C) وطول الخلية (L) ، وأن معامل الإمتصاص المولي لمركب ما يساوي شدة الإمتصاص لمحلول المركب الذي تركيزه 1 مول / لتر وموضوع في خلية طولها 1 سم.

ويعتبر كلاً من λ_{max} و ϵ من الثوابت الفيزيائية التي تميز المركبات العضوية عن بعضها . ولا تصلح هذه العلاقة في حالة التركيزات المرتفعة جداً . لذا ينصح في التطبيق العملي إستعمال المنحنى العياري (Calibration curve) للإمتصاص بدلالة التركيز عند قمة الإمتصاص الضوئي للمركب . كما يمكن تقدير الكثير من المواد التي لا تمتص الضوء مباشرة وذلك بإضافة مركبات معينة لتكون متراكبات ماصة للضوء أو تكون مجموعة إمتصاص (Chromophore) .

- 1- المصدر الضوئي
- 2- خلية العينة
- 3- موحد طول الموجة
- 4- الكشف
- 5- الشاشة: (Monitor)

المصادر الضوئية:

يوجد نوعين من المصادر الضوئية الأول عبارة عن لمبة تنجستن (lamp - Tungsten) بالنسبة لقياس الأشعة المرئية (Visible) في المدى (350 – 800)

المصدر الضوئي هو عبارة عن لمبة ديوتيريوم (lamp D2 -) وهي لمبة لا يفض مشاهدتها بالعين المجردة لأنها يمكن أن تسبب العمى المؤقت نظراً لقوة إشعاعها. هذا بالنسبة لقياس الأشعة فوق البنفسجية في المدى (200-350).

خلية العينة : Sample Cell

وهي إما أن تكون مصنوعة من الزجاج أو تكون مصنوعة من الكوارتز والكوارتز أفضل لأن الخلية المصنوعة من الزجاج من ضمن مكونات صنعها الصوديوم الذي يمتص في مجال UV لذلك يفضل إستخدام خلايا مصنوعة من الكوارتز وهذه الخلايا لا يكون من ضمن مكونات صنعها الصوديوم .

موحد طول الموجة: (Monochromator)

هو عبارة عن المنشور الزجاجي وهذا المنشور كان يستخدم في الأجهزة القديمة أما حالياً في الأجهزة الحديثة للتحليل الطيفي أصبح هنالك ما يسمى بالمحزوز ووظيفته أنه يقوم بفحص العينة لتحديد طول الموجي الذي حدث عنده أعلى إمتصاصه فعندما يسقط الضوء سواءً ضوء من لمبة تنجستن لقياس الأشعة المرئية أو من لمبة ديوتيريوم لقياس الأشعة فوق البنفسجية تتجه للموحد طول الموجة حزم كثير من الضوء يقوم Monochromator بعملية إستقبال الحزمة التي تكون زاوية سقوطها مناسبة على موحد طول الموجة ومن ثم يقوم موحد طول الموجة بعملية إنعكاس للأشعة الساقطة عليه موجهاً إيها إلى فلتر يقوم هذا الفلتر بإختيار الحزمة المناسبة بشكل دقيق جداً ومن ثم يستمر انتقال الحزمة إلى مرآة عاكسة تقوم بإرسال الحزمة الضوئية الساقطة إلى خلية العينة ومن ثم إلى الكشاف .

المذيبات المستخدمة لتسجيل الأطياف الإلكترونية:

لتسجيل الطيف الإلكتروني لمركب ما يجب إستخدام محلول المركب تحت الدراسة في مذيب مناسب . والمذيبات المستخدمة لهذا الغرض يجب أن تتميز بإمتصاصية ضعيفة جداً أو لا تمتص على الإطلاق الأشعة في المنطقة التي يمتص فيها المركب . ومن أمثلة هذه المركبات الإيثانول ،الإثيرات، السايكلوهكسان ،والكلوروفورم.

الكشاف: (Detector)

هو الكشاف الذي يبين كمية الضوء الخارج من خلية العينة ويقوم بتوضيح ماإذا كانت كمية الضوء الخارج من خلية العينة مساوي لكمية الضوء الداخل للعينة فإذا حدث ذلك وكانت كمية الضوء الداخل للعينة مساوي لكمية الضوء الخارج من العينة أنه لم يحدث إمتصاص وبالتالي لانحصل إلا على خط مستقيم ليس به أي إمتصاص . أما إذا حدث العكس وكان الضوء الخارج من خلية العينة أقل من الضوء الداخل للعينة نستدل من ذلك حدوث إمتصاص.

أنواع أجهزة التحليل الطيفي للأشعة المرئية وفوق البنفسجية :توجد هنالك العديد من هذه الأجهزة الحديثة إلا أن فكرة عملها واحدة في كل المنتجات وتنقسم هذه الأجهزة إلى ثلاثة أقسام من حيث أستخدامها:

1) أجهزة تقيس طيف الأشعة المرئية فقط أو تقيس طيف الأشعة فوق البنفسجية فقط:

هي أجهزة وحيدة الشعاع وتكون على نوعين النوع الأول يستخدم أنابيب (Test tube) (في عملية التحليل والنوع الآخر يستخدم خلايا (Cell) من الكوارتز أو الزجاج في عملية التحليل . وفكرة هذا الجهاز أنه لإجراء عملية التحليل لا بد في البداية من القيام بتصفير الجهاز ويتم ذلك بإستخدام البلاנק أوالمذيب وبعد تصفير الجهاز ترفع أنبوبة البلاנק أو خلية البلاנק ويوضع في مكانها أنبوبة أوخلية العينة المراد إجراء القياس لها.

في الأجهزة التي تقيس فقط الأشعة المرئية المصدر الضوئي فيها عبارة عن لمبة تنجستن . بينما المصدر الضوئي في الأجهزة التي تقيس الأشعة فوق البنفسجية عبارة عن لمبة الديوتيريوم.

(2) أجهزة تقيس طيف الأشعة المرئية وطيف الأشعة فوق البنفسجية معاً في جهاز واحد:

وهي أجهزة ثنائية الشعاع وهذه الأجهزة ميزتها أنه لا داعي لعملية تصفير الجهاز يدوياً حيث يقوم الجهاز بذلك أوتوماتيكياً . كما أن هذه الأجهزة تحتوي على فتحتين الأولى لخلية البلانك والفتحة الثانية لخلية العينة المراد قياسها . فلو أردنا قياس الطيف المرئي في هذا الجهاز كل ما علينا فعله هو أن نقوم بإختيار المصدر الضوئي المناسب وهو هنا لمبة التنجستن فقط ونضع خلية البلانك في فتحة الخاصة ونضع خلية العينة في الفتحة الثانية ونقوم بإجراء التحليل . أما إذا أردنا إجراء قياس الطيف فوق البنفسجي فقط فما علينا إلا أن نختار لمبة الديوتيريوم فقط.

تطبيقات طيف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية:

يعتبر طيف إمتصاص الأشعة في المجال المرئي وفوق البنفسجي وسيلة مفيدة لتأييد دليل على تركيب بنائي معين لمركب ما ويندر وجود إمتصاص مختار يعطي برهاناً قاطعاً على تفاصيل تركيب معين لكن بالطبع يمكن أن تساعد في ترجيح أحد الاحتمالات المتعددة . وعلى سبيل المثال فإن عدم وجود إمتصاص في المجال 270 – 280 نانومتر يعتبر دليلاً قاطعاً على عدم وجود حلقة بنزين في المركب، كما أن إنعدام الإمتصاص من 210 نانومتر حتى المجال المرئي دليل قاطع على عدم وجود روابط ثنائية متناوبة . وإن عدم وجود الإمتصاص حتى 180 نانومتر فإن هذا دليل على عدم وجود رابطة ثنائية في المركب.

يمكننا تلخيص ما يحدث في المضواء الطيفي بالخطوات التالية:

- 1- يرد الضوء من المنبع الضوئي خلال العينة.
- 2- تمتص العينة الضوء.
- 3- يلتقط اللاقط الضوئي كمية الضوء الباقية بعد مرورها خلال العينة.
- 4- يحول اللاقط الضوئي كمية الضوء الممتصة من قبل العينة إلى رقم.
- 5- ترسم النتيجة ضمن مخطط مباشرة، أو تنقل إلى حاسوب لمعالجتها (تنعيم المنحني، تصحيح الخط المرجعي).

معظم المضوءات الطيفية يجب أن تعابير في عملية تسمى التصفير (zeroing) ، حيث تعتبر امتصاصية بعض المواد المرجعية كقيمة للخط المرجعي، ولذلك تسجل الامتصاصية لجميع المواد نسبة إلى مادة مبدئية مصفرة. يظهر عندها المضوء الطيفي الامتصاصية كنسبة مئوية (كمية الضوء الممتص نسبة إلى المادة الأولية).

نصائح هامة عن استخدام الجهاز

الصيانة الدورية للجهاز؟

- تغيير مصدر الضوء باستمرار .
- العمل على نظافة العدسات و المرايا و طرق مرور الضوء .
- الحرص على عدم لمس العدسات و عدم وصول الأتربة اليها .
- الحذر عند التعامل مع تلك العدسات و تنظيفها بشئ ناعم .

الأعطال الرئيسية التي قد تحدث :

- حدث التلف في مصدر الضوء .
- حدوث أتساخ في العدسات و المرايا يؤدي الى ظهور نتائج خاطئة .

ملاحظات أمان من الجهاز :

- وصول الأشعة البنفسجية الى العين قد يؤذيها .
- الحرص من الجهد العالي المستخدم في الجهاز .
- عند عمل أى شئ في الجهاز يجب فصل مصدر الطاقة .

تحضير المحاليل والكواشف للقياس :

1 -العينة (Sample المجهول): مصل او بلازما او غيرها من السوائل البيولوجية والتي نبحث عن تركيز مادة مجهولة فيها مثل السكر او غيره حيث تضاف لها كواشف العمل وتمر بنفس خطوات القياس .

2-العياري :Standard محلول يحوي تركيز معلوم من مادة مشابهة للمادة المجهولة المراد معرفة تركيزها

مثال السكر .

3- Blank: محلول يحوي كل كواشف العمل لكن اليحوي العياري او العينة ، الغاية منه تعويض الوان غير النوعية الموجودة في كواشف العمل ويتم تفسير جهاز العمل عليه

تطبيق قانون بيير لحساب تركيز مادة ما في دم الانسان :

$$A=K \times C \times L$$

من قبل محلول ما طردا مع تركيز Absorption حيث يتناسب امتصاص الضوء هذه concentration

المادة في المحلول.

$$\frac{\text{الكثافة الضوئية } (A) \text{ للمجهول } T}{\text{الكثافة الضوئية } (A) \text{ للعياري } St} = \frac{\text{العينة تركيز (مجهول) } T}{\text{التركيز العياري } St}$$

$$\text{Conc. of } T = \frac{A \text{ of } T \times \text{Conc. of } St}{A \text{ of } St}$$

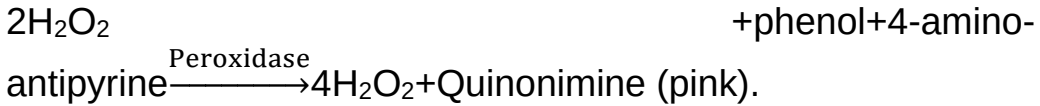
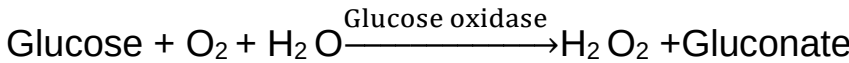
تقدير تركيز الكلوكوز في مصل الدم

Determination of serum glucose concentration:

يحصل الجسم على السكريات أو الكربوهيدرات من الغذاء، بعد هضم هذه السكريات فإنها تتحلل لتتحول إلى سكريات بسيطة، الكلوكوز هو السكر الأساسي الذي يستخدمه الجسم لإنتاج الطاقة، وهو ضروري لأنسجة الجسم وخاصة أنسجة الدماغ.

المبدأ الأساس Basic principle:

تقدير تركيز كلوكوز مصل الدم إنزيمياً باستخدام عدة التحليل الجاهزة Kit (حسب الشركة المجهزة)، يتعين الكلوكوز بعد الأكسدة الإنزيمية بوجود إنزيم Glucoseoxidase، إذ يتكون بيروكسيد الهيدروجين الذي يتم الكشف عنه بواسطة محلول 4-amino-antipyrine بوجود إنزيم peroxidase، عند ذلك سيظهر لون وردي ناتج عن تكون مادة Quinonimine وتعتمد شدته على كمية الكلوكوز الموجود في المصل وفق المعادلة الآتية :



الحسابات Calculation

يتم حساب تركيز الكلوكوز حسب المعادلة الآتية :

$$\text{Glucose concentration (mg / 100ml)} = \frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Standard}} \times \text{Standard Conc}$$

الامتصاصية (A)=Absorbance
Standard concentration=100mg/100ml

تقدير تركيز الكوليسترول في مصل الدم

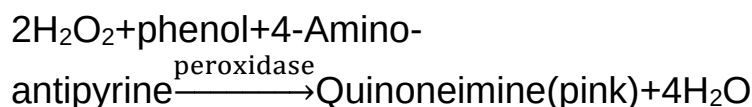
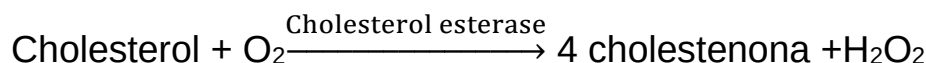
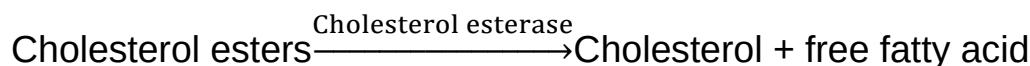
Determination of serum cholesterol concentration:

يساعد فحص الكوليسترول على تحديد خطر تراكم الترسبات الدهنية في الشرايين، والتي يمكن أن تتسبب في تضيق أو انسداد الشرايين في الجسم أو ما يسمى بتصلب الشرايين. فحص الكوليسترول مهم جدا وغالبًا ما تشكل مستويات الكوليسترول المرتفعة عامل خطر كبيرًا للإصابة بمرض الشريان التاجي.

يتم قياس تركيز الكوليسترول في مصل الدم باستخدام عدة التحليل kit (حسب الشركة المجهزة)

المبدأ الأساس Basic principle:

يقوم إنزيم cholesterol oxidase بأكسدة الكوليسترول بوجود إنزيم peroxidase وبوجود مادة واهية للهيدروجين، تتأكسد المادة الأساس عديمة اللون إلى صبغة الكينونيمين Quinonimine الوردية اللون وحسب المعادلات الآتية :



الحسابات Calculation :

$$\text{Glucose concentration (mg / 100ml)} = \frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Standard}} \times \text{Standard Conc}$$

الامتصاصية (A)=Absorbance

Standard Concentration= 200 mg/100ml

تقدير تركيز الكليسيريدات الثلاثية

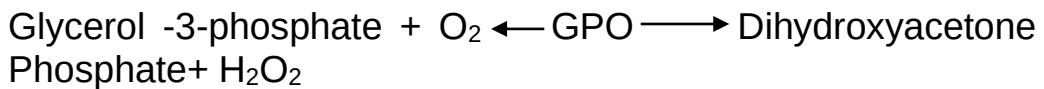
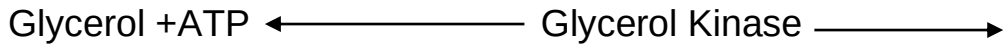
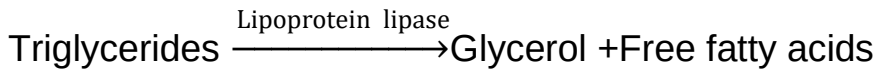
Determination of serum triglycerides concentration:

الدهون الثلاثية هي أحد أنواع الدهون الموجودة في الدم، فعند تناول الطعام، يحوّل الجسم أيّ سعرات حرارية لا تحتاج إلى استخدامها على الفور إلى دهون ثلاثية. تُخزّن الدهون ثلاثية الكليسيريد في الخلايا الدهنية. في وقت لاحق، تطلق الهرمونات الدهون الثلاثية للإمداد بالطاقة بين الوجبات.

تقدير تركيز الكليسيريدات الثلاثية في مصل الدم باستخدام عدة التحليل Kit (حسب الشركة المجهزة)

المبدأ الأساس Basic principle:

تعتمد هذه الطريقة على أساس تحليل الكليسيريدات الثلاثية إنزيمياً إلى الكليسرول والذي يمر خلال سلسلة تفاعلات لينتج في النهاية معقد وردي اللون وحسب المعادلات الآتية:



الحسابات Calculation :

تم حساب تركيز الكليسيريدات الثلاثية في المصل وفق القانون الآتي:

$$\text{Triglycerides concentration (mg / 100ml)} = \frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Standard}} \times \text{Standard Conc}$$

(A) Absorbance الامتصاصية.

Standard concentration = 200 mg/100ml .

تقدير تركيز البروتينات الدهنية عالية الكثافة للكلسترول في مصل الدم

Determination of serum high density lipoprotein-cholesterol concentration (HDL-C):

الكوليسترول هو مادة شمعية توجد في جميع خلايا الجسم اذ تؤدي العديد من الوظائف المفيدة، منها المساعدة في بناء خلايا الجسم. وتُنقل هذه المادة خلال مجرى الدم مرتبطة بنوع من البروتينات. يسمى هذا النوع من البروتينات: البروتينات الدهنية.

عرف كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة باسم الكوليسترول "المفيد" لأنه يساعد في تخليص مجرى الدم من أشكال أخرى من الكوليسترول، ويرتبط ارتفاع مستويات كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة بانخفاض مخاطر الإصابة بأمراض القلب.

تقدير تركيز البروتينات عالية الكثافة للكوليسترول في مصل الدم باستخدام عدة التحليل Kit (حسب الشركة المجهزة).

المبدأ الأساس Basic principle

يعتمد في قياس تركيز HDL-C على استخدام الطريقة الإنزيمية التي تتضمن الترسيب الكمي للبروتينات الدهنية واطئة الكثافة LDL-C وواطئة الكثافة جدا VLDL-C والكيلومايكرونات Chylomicrons عند إضافة حامض الفوسفوتنكستن بوجود أيونات كلوريد المغنسيوم. وأن الراشح الذي يتم الحصول عليه بعد عملية الفصل باستخدام الطرد المركزي يكون حاوياً على HDL-C فقط، إذ تم تقديره باستخدام المحلول الإنزيمي للكوليسترول.

الحسابات Calculations :

$$\text{HDL - C concentration (mg / 100ml)} = \frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Standard}} \times \text{Standard Conc}$$

(A) Absorbance. الامتصاصية

Standard concentration = 100 mg/100ml .

حساب تركيز البروتين الدهني واطئ الكثافة للكوليسترول في مصل الدم

Determination of serum low density lipoprotein-cholesterol concentration (LDL-C):

يمكن لمستويات عالية من البروتين الدهني منخفض الكثافة أن تتراكم في النهاية على جدران الأوعية الدموية ما يؤدي إلى تضيق تلك المسارات، وفي بعض الأحيان قد تتكوّن جلطة نتيجة لذلك وتعلق في ذلك الحيز الضيق مسببة نوبة قلبية أو سكتة دماغية، ولهذا يشار إلى كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة بالكوليسترول الضار.

يتم حساب تركيز LDL-C في مصل الدم اعتماداً على العلاقة الآتية

LDL-C concentration (mg/100ml) = Total cholesterol –HDL-C – VLDL-C.

حساب تركيز البروتين الدهني واطئ الكثافة جداً للكوليسترول في مصل الدم

Determination of serum very low density lipoprotein cholesterol concentration (VLDL-C):

في فحص البروتينات الدهنية منخفض الكثافة جداً يتم التحقق من تركيز البروتينات الدهنية منخفض الكثافة جداً في البلازما، لذ تعد شكلاً من أشكال تخزين الدهون في الدم.

يتم حمل الدهون في الدم بعدة أشكال، مثل: الكوليسترول الموجود في الكبد، أو كدهون تخزن حول الأنسجة المحيطة، أو كدهون ثلاثية، قد يزيد مستوى الدهون المرتفع من مخاطر الإصابة بأمراض القلب، لأنها عادةً تترافق مع ارتفاع بمستوى الكوليسترول.

يتم حساب تركيز VLDL-C في مصل الدم اعتماداً على العلاقة الآتية

VLDL concentration (mg/100ml) = (Triglycerides / 5).

حساب مستويات دلائل التعصد :Atherogenic indices count

مستوى دليل التعصد الأول:

$$\frac{TC}{HDL-C} = \text{دليل التعصد الاول}$$

مستوى دليل التعصد الثاني:

$$\frac{LDL-C}{HDL-C} = \text{دليل التعصد الثاني}$$

مستوى دليل التعصد الثالث:

$$\frac{VLDL-C + LDL-C}{HDL-C} = \text{دليل التعصد الثالث}$$

تقدير تركيز البروتين الكلي

Determination of serum total protein concentration:

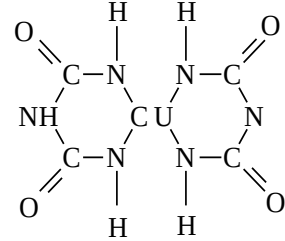
وهو عبارة عن فحص لقياس النسبة الاجمالية للبروتين في الدم، تعمل البروتينات بمثابة لبنات بناء للعديد من الهرمونات والإنزيمات في الجسم، ولهذا السبب غالباً ما تتضمن الفحوصات الصحية الروتينية اختبار البروتين الكلي.

يفحص الاختبار البروتين في البول أو في الجزء السائل من الدم، والذي يُسمى بالمصل. يتم تقدير تركيز البروتين الكلي في مصل الدم باستخدام عدة التحليل Kit (حسب الشركة المنتجة)

المبدأ الأساس :Basic principle

Protein

—————→ Cu-Proteinate



Coloured Complex

تعتمد هذه الطريقة على أساس البروتينات في المحيط القاعدي، وتكون مع أيونات النحاسيك Copper ions II معقداً أزرقاً- بنفسجياً— Coloured Complex blue Violet كما في المعادلة أدناه، تتناسب الكثافة اللونية لهذا المعقد تناسباً طردياً مع تركيز البروتينات الكلية في المصل.

الحسابات : Calculations

كما في المعادلة الآتية:

$$\text{Total protein concentration (g /100ml)} = \frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Standard}} \times \text{Standard Conc}$$

(A) Absorbance الامتصاصية

Standard concentration =6g/100ml.

تقدير تركيز الألبومين في مصل الدم

Determination of serum albumin concentration:

الألبومين هو أحد البروتينات التي تُصنَّع عن طريق الكبد، إذ تبلغ نسبته حوالي 60% من إجمالي البروتينات الموجودة في الدَّم، ويلعب الألبومين دوراً مهماً في الحفاظ على السوائل ومنع تسربها من الأوعية الدموية، كما أنه يُساهم في تغذية الأنسجة، ونقل العديد من المواد عبر الأنحاء المختلفة من الجسم؛ بما في ذلك الهرمونات، والفيتامينات، والأدوية، والكالسيوم يتم تقدير تركيز الألبومين في مصل الدم باستخدام عدة التحليل Kit (حسب الشركة المنتجة).

المبدأ الأساس :Basic principle

تعتمد هذه الطريقة على كمية الألبومين عند pH 4.2 يرتبط هذا المركب مع الكاشف رباعي بروموكريسول الأخضر 3،3،5، BCG، 5-Bromocresol green ليكون معقداً لونياً هو البومين بروموكريسول الأخضر BCG-albumin complex ذا اللون الأخضر تقاس شدته عند طول موجي 630 نانومتر في المطياف الضوئي.

الحسابات : Calculations

يتم حساب تركيز الألبومين في المصل وفق القانون الآتي:

$$\text{Albumin concentration (g / 100ml)} = \frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Standard}} \times \text{Standard Conc}$$

(A)Absorbance.الامتصاصية.

Standard concentration =5 g/100ml .

حساب تركيز الكلوبولين في مصل الدم

Determination of serum globulin concentration:

الكلوبولين هي مجموعة من البروتينات في الدم، يتم صنعها في الكبد بواسطة جهاز المناعة إذ يلعب الكلوبولين دوراً مهماً في وظائف الكبد وتجلط الدم ومكافحة العدوى يتم حساب الكلوبولين في مصل الدم تبعاً للمعادلة الآتية:

$$\text{Concentration of globulin (g/100ml)} = \text{Total protein Conc.} - \text{Albumin Conc.}$$

تقدير تركيز اليوريا في مصل الدم

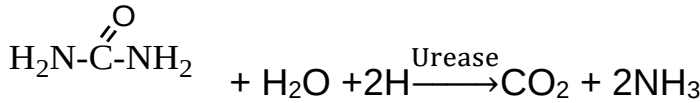
Determination of serum urea concentration:

اليوريا (Urea) هو مركب كيميائي يوجد في جسم الإنسان في الدم واللمف، ويتم التخلص منه عن طريق البول، إذ يتم تصنيعه في الكبد من الأحماض الأمينية ومركبات الأمونيا، واليوريا هي الفضلات التي تخرج من الجسم؛ سواء أكان مصدرها من داخل الجسم نفسه أم من خارجه، إذ إنه إما أن ينتج عن تكسير البروتينات نتيجة عمليات تجديد أنسجة الجسم، وإما عن نزح الأمين من الأحماض الأمينية التي يتم امتصاصها من الأغذية. وتعدّ اليوريا من أهم فضلات التمثيل الغذائي للبروتين في جسم الإنسان، ويعدّ ارتفاع نسبة اليوريا في الدم مؤشراً على وجود مشكلة في الجسم، حيث من المهم قياس نسبة اليوريا في الدم في العديد من المشاكل الصحية.

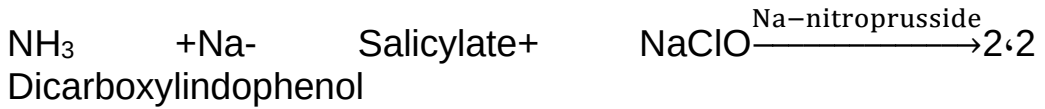
يتم تقدير تركيز اليوريا Urea في مصل دم الجرذان باستخدام عدة التحليل الجاهزة Kit (حسب الشركة المنتجة).

المبدأ الأساس :Basic principle

تتحلل اليوريا مائياً إلى الأمونيا Ammonia وCO₂، وتتفاعل الأمونيا مع الساليسيلات Salicylate ومركب هايپوكلوريت Hypochlorite لتكون مركب Green indophenol، وتتناسب الكثافة اللونية مع تركيز اليوريا في الدم، وحسب المعادلتين الآتيتين:



(Urea)



(Green color)

الحسابات : Calculation

$$\text{Urea concentration (mg / 100ml)} = \frac{(\text{A}) \text{ Sample}}{(\text{A}) \text{ Standard}} \times \text{Standard Conc}$$

Absorbance (A) الامتصاصية .

Standard concentration = 40 mg/100ml or (6.66 mmol/L).

تحليل الكرياتينين creatinine test

كرياتينين الدم، كرياتينين المصل يطلب هذا التحليل لقياس وظائف الكليتين ومتابعة أمراض الكلى، اذ يطلب الطبيب هذا التحليل بشكل روتيني ضمن معاينة شاملة عندما يشتبه بوجود خلل في وظائف الكلى أو من وجود مرض حاد أو مزمن من شأنه أن يؤثر سلباً على وظائف الكلى بالإضافة الى ذلك يطلب التحليل عند إستخدام المريض أدوية من الممكن أن تسبب سمية كلوية ومتابعة سير الأمراض الكلوية. تجمع العينة الدموية من أوعية الذراع.

نسب الكرياتينين الطبيعية :

الرجال: نسبة الكرياتينين الطبيعية لديهم أعلى منها عند النساء، وذلك لامتلاكهم كتلة عضلية أكبر وأقوى، لذلك فإن نسبة الكرياتينين الطبيعية لديهم تتراوح من 0.6-1.2، ملليغرام لكل ديسيلتر، وذلك في الذكور البالغين.

للنساء: تتراوح نسبته لدى النساء البالغات من 0.5-1.1، ملليغرام لكل ديسيلتر.

النباتيون: لديهم نسبة كرياتينين منخفضة مقارنة مع الأشخاص الذين يتناولون اللحوم. الرجال أصحاب العضلات: تكون النسبة لديهم أعلى بشكل عام.

كبار السن: تكون النسبة لديهم أقل بشكل عام.

الأطفال الرضع: النسبة الطبيعية لديهم تبدأ من 0.2 ملليغرام لكل ديسيلتر، وتبدأ بالزيادة بحسب تطور عضلاتهم. الأشخاص الذين لديهم كلية واحدة: تكون النسبة الطبيعية لديهم 1.8 أو 1.9 ملليغرام لكل ديسيل

المبدأ الاساس:

يعتمد طريقة jaffe اللونية على تفاعل كرياتينين العينة مع حامض البيكريت في وسط قاعدي و انتاج اللون الاحمر الناتج من تفاعل البكرات مع الكرياتينين الموجود في العينة عند طول موجي 490 نانوميتر قرأت الإمتصاصية بالجهاز Spectrophotometre عند 490 nm (تقدر مستوى الكرياتينين في المصل بإستخدام عدة التحليل Kit الوحسب الشركة المنتجة)

الحسابات

(A₁-A₂) لمحلول الاختبار (Sample)

تركيز الكرياتينين = $\frac{(A_1 - A_2) \text{ للمحلول القياسي (Standard)}}{\text{تركيز المحلول القياسي} \times}$

تقدير تركيز حامض اليوريك في مصل الدم

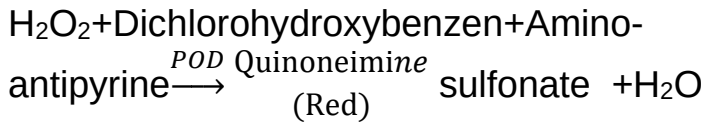
Determination of serum uric acid concentration:

تقدير تركيز حامض اليوريك في مصل الدم باستخدام عدة التحليل Kit (حسب الشركة المنتجة).

المبدأ الأساس :Basic principle

تعتمد هذه الطريقة على أساس فعالية إنزيم اليوريكاز Uricase الذي يتفاعل مع حامض اليوريك لينتج مركب Allantoin و CO_2 وبيروكسيد الهيدروجين. وبوجود إنزيم بيروكسيداز (POD) يتفاعل بيروكسيد الهيدروجين مع المركبين

(AAP Amino-antipyrine)، (Dichloro-hydroxybenzenesulfonate) ليعطي معقد لوني أحمر وحسب المعادلات الآتية:



الحسابات : Calculation

يتم حساب تركيز حامض اليوريك في المصل وفق القانون الآتي :

$$\text{Uric acid concentration (mg / 100ml)} = \frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Standard}} \times \text{Standard Conc}$$

(A) Abso
الامتصاصية rban

Standard concentration = 10 mg/100ml or (595 $\mu\text{mol/L}$) .

تقدير فعالية الأنزيمات الناقلة لألمين GOT و GPT

يستخدم Kit للطريقة اللونية لتقدير فعالية الأنزيمات الناقلة لألمين GOT و GPT (حسب الشركة المنتجة).

الحسابات Calculation

يتم قراءة امتصاصية جميع الانابيب وتستخدم المعادلتين لحساب فعالية الانزيمين:

$$\text{GOT في المصل (وحدة/دولية)} = \frac{133 \times \text{الاختبار - السيطرة}}{\text{القياسي - البلاנק}}$$

$$\text{GPT في المصل (وحدة/دولية)} = \frac{67 \times \text{الاختبار - القياسي - البلاנק}}{\text{القياسي - البلاנק}}$$

تقدير تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم

Determination of serum glutathione concentration:

المبدأ الأساس Basic principle :

يقدر تركيز الكلوتاثيون في المصل باستخدام الطريقة المحورة المتبعة من الباحثين (Tietz, Sedlak & Lindsay ; 1968, 1999). وتعتمد هذه الطريقة على استخدام كاشف إلمان Ellman's reagent الحاوي على 5,5-dithio bis2-Nitrobenzoic acid (DTNB)، إذ يتفاعل الكاشف بسرعة مع الكلوتاثيون ويختزل بواسطة مجموعة السلفاهيدرال SH group للكلوتاثيون لينتج مركب أصفر اللون يتم قراءة الامتصاص له عند طول موجي 412 نانوميتر، وإن تركيز الناتج المتكون يعتمد على تركيز الكلوتاثيون الموجود في المصل.

تحضير المحاليل اللازمة لتعيين تركيز الكلوتاثيون:

1- محلول حامض السلفوساليسيليك Sulfosalicylic acid solution :

يحضر بإذابة 4 غم من حامض السلفوساليسيليك في 100 مل من الماء المقطر ويحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

2- محلول داري الفوسفات Phosphate buffer solution :

يحضر بمزج (0.6M KH₂PO₄) و (0.08M Na₂HPO₄) ، وضبط الأس الهيدروجيني عند (pH 8) بواسطة قطرات من (0.6M KH₂PO₄) .

3- محلول كاشف إلمان Ellman's reagent solution :

يحضر بتركيز 0.1 mM ملي مول، بإذابة 0.004 غم من مادة DTNB في 100 مل من محلول فوسفيت المنظم (pH 8) ويحضر مباشرة قبل الاستعمال ويوضع في قنينة معتمة بعيداً عن الضوء .

طريقة العمل Procedure :

يتم تقدير الكلوتاثايون حسب الجدول الآتي :

Blank	Test	
-	150 μ l	Serum
150 μ l	-	Distilled water
150 μ l	150 μ l	Sulfosalicylic acid 4%
تمزج وتوضع في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دور/دقيقة لمدة 5 دقائق ثم يتبع ما يأتي:		
150 μ l	150 μ l	Supernatant
4.5ml	4.5ml	Ellman's reagent 0.1mmol

تقراء الامتصاصية للمحلول باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 412 نانوميتر.

الحسابات Calculations :

يحسب تركيز الكلوتاثايون في مصل الدم باستخدام المعادلة الآتية :

$$\text{The concentration of GSH } \mu\text{mol/L} = \frac{A_{test} - A_{blank}}{E_0 \times L} \times 10^6$$

E_0 = Extinction coefficient $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

L = light bath 1 cm

A = Absorbance الامتصاصية

تقدير تركيز المالون ثنائي الديهايد في مصل الدم

Determination of serum malondialdehyde concentration:

المبدأ الأساس Basic principle:

يقدر تركيز المالون ثنائي الديهايد في المصل باستخدام الطريقة المحورة التي ذكرها (Guidet & Shah, 1989) من خلال قياس كمية المالون ثنائي الديهايد وهو يمثل أحد النواتج الرئيسية لبيروكسدة الدهون، وتعتمد الطريقة على التفاعل بين بيروكسيدات الدهون وبشكل رئيس المالون ثنائي الديهايد وبين حامض ثايوباربيتوريك Thiobarbituric acid (TBA) ويتم هذا التفاعل في وسط حامضي وتكون ناتج ملون (كما في المعادلة في أدناه)، وتقاس شدة الامتصاص له عند 532 نانوميتر.

تحضير المحاليل اللازمة لتعيين تركيز المالون ثنائي الأليدهايد:

1- محلول حامض الثايوباربيتوريك (TBA- solution) : يحضر بإذابة 0.6 غم من مادة الـ TBA في 100 مل من الصودا الكاوية NaOH بتركيز 0.05 مولاري باستخدام القليل من التسخين، ويحضر المحلول أنيا عند الاستعمال .

2- محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور (TCA-solution) Trichloroacetic acid

يحضر هذا المحلول بتركيزين، التركيز الأول 17.5% حضر بإذابة 17.5 غم من مادة TCA في 100 مل من الماء المقطر، والتركيز الثاني 70% يحضر بإذابة 70 غم من المادة نفسها في 100 مل من الماء المقطر ويحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام .

طريقة العمل Procedure :

يتم تقدير المالون ثنائي الأليدهايد حسب الجدول الآتي :

Blank	Test	
-	150 μ l	Serum
150 μ l	-	Distill water
1 ml	1 ml	TCA (17.5%)
1 ml	1ml	TBA (0.6%)
يمزج جيداً ثم يحضن في حمام مائي مغلي لمدة 15 دقيقة ثم يركن لتبرد في درجة حرارة الغرفة وأضيف :		
1 ml	1 ml	TCA (70%)

ثم تترك الأنابيب بدرجة حرارة 37م لمدة 20 دقيقة ثم يفصل الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / الدقيقة لمدة 15 دقيقة وتقرأ شدة الامتصاص للراشح المتكون عند طول موجي 532 نانوميتر.

الحسابات : Calculation

يقدر تركيز المألون ثنائي الأليهايد اعتماداً على المعادلة الآتية :

$$\text{The concentration of malondialdehyde } (\mu\text{mol/l}) = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{L \times E_0 \times D} \times 10^6$$

$$10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot E_0 = \text{Extinction coefficient } 1.56$$

L = light bath 1 cm.

A= Absorbance.

$$D = \text{Dilution factor} = \frac{1 \text{ ml vol used in Ref}}{0.15} = 6.7$$

تقدير فعالية إنزيم (SOD) Superoxide Dismutase

المبدأ الأساس Basic principle

تستند هذه الطريقة على قدرة الـ SOD على تثبيط أكسدة الأدرينالين إلى أدرينوكروم (مادة كيميائية تنتج بشكل طبيعي خلال تأكسد الأبنفرين epinephrine والتي تستخدم دواءً لتقليل النزف وتسمى أيضاً بالكربازوكروم). والتفاعل يتم في 37 م ° .

طريقة العمل Procedure

1. يؤخذ 0.1 مل من العينة (مصل الدم)، وتخفف في 1.8 مل من الـ 50mM buffer carbohydrate (pH 10.2).
2. يمزج 1 مل من الأبنفرين epinephrine و 1 مل من الـ EDTA (pH 10.2) تم تقاس الامتصاصية عند 480 نانوميتر مباشرة بعد إضافة الأبنفرين، وبعد 5 دقائق يتم احتساب النسبة المئوية من التثبيط على النحو الآتي:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}$$

ومن ثم احتساب فعالية الإنزيم حسب المعادلة الآتية:

$$SODactivity(U/mL) = \frac{\%Inhibition \times 2}{5} \times 30$$

30 تعني عدد المحاليل المستخدمة 10×

ملاحظة مهمة:

عزيزي القارئ التحاليل التي تتم بتقنية الاليزا او المطياف الضوئي قد يلاحظ هناك اختلاف بسيط في طرق العمل حسب الشركة المجهزة لعدة القياس (Kit).

السيرة الذاتية (CV)



الاسم : د. هيثم لطيف عبد الهادي صكر الكبيسي

اولا : معلومات عامة

1.العنوان:

• العمل : جامعة الانبار - كلية التربية للعلوم الصرفة // قسم علوم

الحياة

• التخصص: علوم الحياة الدرجة العلمية: دكتوراه // أستاذ مساعد

• العنوان البريدي: الانبار / بريد الانبار / ص.ب : 156

• نقال: 07817336033

• البريد الالكتروني : haytham.lateif@uoanbar.edu.iq

2.معلومات شخصية :

الجنسية : عراقي

مكان الولادة : الانبار / الرمادي

جواز سفر: A 12340928

تاريخ الولادة : 1977/2/14

عدد الأطفال : طفل واحد

الحالة الاجتماعية : متزوج

ثانيا : المؤهلات العلمية :

الدرجة	الجامعة	الدولة	تاريخ الحصول عليها
البكالوريوس	الانبار	العراق	2000/1999
الماجستير	الانبار	العراق	2006
الدكتوراه	المنصورة	مصر	2016

❖ عنوان رسالة الماجستير:

دراسة دمية وراثية خلوية بينية لعمال المجمع الكيميائي للفوسفات في القائم.

❖ عنوان أطروحة الدكتوراه :

دور البنكالاجين في تعديل الاجهاد التأكسدي وعوامل الخطورة القلبية في الجرذان المستحثة تجريبياً بمرض السكري

الفصل الرابع

فلم الدم Blood Film

م.م شهد قاسم محمد الحمداني

هو فحص مختبري يستخدم لفحص خلايا الدم المختلفة مجهرياً حيث يستخدم للكشف عن أمراض الدم Hematology أو عن وجود بعض الطفيليات بالدم Parasites .

يُعرف كذلك فحص الدم على أن هو فحص يستخدم للبحث عن التشوهات في خلايا الدم ، وتحديد العلاجات المناسبة، وغيرها من الحالات التي تنتج تغييرات في خلايا الدم ، وتقسم خلايا الى الثلاثة أقسام التي يُركز عليها الاختبار blood film هي :-

❖ الخلايا الحمراء Red Blood Cell أو (Erythrocytes)

❖ الخلايا البيضاء White Blood Cells. أو (Leucocytes)

❖ الصفائح الدموية Platelets أو (Thrombocytes)

يوفر هذا الاختبار معلومات عن عدد هذه الخلايا وشكلها، والتي يمكن أن تساعد الأطباء في تشخيص بعض أمراض الدم أو غيرها من الحالات الطبية، سوف نوضح لكم وظيفة كل من الخلايا الدم وأثرها على عملية فحص الدم blood films

1- خلايا الدم الحمر [RBCs] Red Blood Cell

كريات الدم الحمراء (RBCs) هي عبارة عن تراكيب قرصية الشكل، مقعرة الوجهين، تم تصنيعها في نخاع العظم Bone marrow استجابة لتحفيز هرمون الأريثروبويتين Erythropoietin عن طريق عملية الإريثروبوييزيس (Erythropoiesis)، وشكلها المميز له علاقة كبيرة بوظيفتها في عملية نقل غاز (O₂) الأوكسجين، أي أنها توفر زيادة في المساحة السطحية والتي من خلالها يمكن للغاز ان ينتشر. يتراوح معدل عمر كرية الدم الحمراء 120 يوم، اما بالنسبة لتركيزها في الدم فهو يقارب 3.85 - 5.16 مليون / ميكرو لتر في النساء و 4.54 - 5.78 مليون / ميكرو لتر في الرجال ، يمكن أن يؤثر عدم انتظام عدد كريات الدم الحمراء، أو شكلها على كيفية انتقال الأوكسجين في الدم. وغالباً ما تحدث هذه التشوهات بسبب نقص في المعادن أو الفيتامينات، ولكن يمكن أيضاً أن تكون بسبب الأمراض الطبية الموروثة، مثل فقر الدم المنجلي

Normal Canine RBCs 	• 7µm in diameter • biconcave disc with area of central pallor • uniform size
Normal Feline RBCs 	• 5.8µm in diameter • very slight or inapparent central pallor • slight anisocytosis

شكل (1-4) خصائص كريات الدم الحمراء

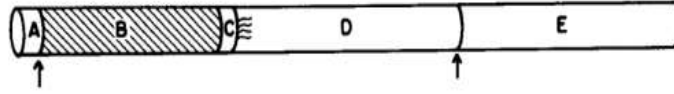
وسائل تقييم الخلية الحمراء Means of Evaluating the Red Cell

إن حجم الخلية المضغوطة (PCV) ، وعدد الخلايا الحمراء (RCC) والهيموجلوبين (Hgb) كلها قياسات لكثافة الخلية الحمراء.

يساعد معدل حجم كريات الدم الحمراء (MCV) و معدل الهيموكلوبين (MCH) و معدل تركيز الهيموكلوبين (MCHC) على تحديد ما إذا كانت الخلايا طبيعية أم كبيرة أم صغيرة الحجم (MCV)، أما إذا كانت تحتوي على تركيز طبيعي من Hgb (MCH and MCHC)

حجم كريات الدم المتراسة (PCV)

تعرف باسم Hematocrit ويُرمز له (Hct) وهو النسبة المئوية لحجم كريات الدم الحمراء في الدم بصورة كاملة، ويتم قياسها عن طريق تعبئة الخلايا الحمراء في أنبوب الهيماتوكريت ونضعه في جهاز طرد مركزي (centrifuge)، والذي يمكن أن يُستخدم كمؤشر لفقر الدم ويشير إلى درجة فقدان السوائل، وأن العوامل التي تؤثر على كريات الدم الحمراء تؤثر على حجم كريات الدم المتراسة.



MICROHEMATOCRIT TUBE

- A - Clay seal
- B - Packed erythrocytes
- C - Packed leukocytes and platelets (buffy coat)
- D - Plasma
- E - Empty space at top of tube

{White blood cells}

2- خلايا الدم البيضاء

هي إحدى خلايا الدم الرئيسية بالإضافة للخلية الحمراء والصفائح الدموية. الوظيفة الرئيسية لهذه الخلايا هي الدفاع عن الجسم ضد الأمراض المعدية، وهي جزء لا يتجزأ من نظام المناعة في الجسم ، يمكن أن يشير وجود عدد كبير أو عدد قليل جداً من خلايا الدم البيضاء إلى وجود اضطراب في الدم. غالباً ما تؤدي الاضطرابات التي تؤثر على هذه الخلايا، إلى عدم قدرة الجسم على التخلص من العدوى أو غيرها من المشاكل الالتهابية أو القدرة على السيطرة عليها، يمكن كذلك يساعد في تقييم عدد خلايا الدم البيضاء في تحديد التشوهات التي قد توحى بأمراض معينة مثل العدوى الفيروسية أو البكتيرية أو حتى عملية الأورام.

{Types of white blood cells}

أنواع خلايا الدم البيضاء

هناك عدة أنواع مختلفة من خلايا الدم البيضاء. يتم تصنيفها حسب وجود حبيبات في الساييتوبلازم، الى محببة (Granulocytes) وغير محببة (Non-granular leukocytes)

- **المحببة Granulocytes:** تتميز الكريات البيضاء بوجود حبيبات مختلفة في الساييتوبلازم عندما ينظر إليها تحت المجهر الضوئي. هذه الحبيبات هي إنزيمات مرتبطة بالغشاء وتقوم بهضم الجسيمات المبتلعة. وهناك ثلاثة أنواع من الكريات البيضاء المحببة: خلية متعادلة Neutrophil، خلية قاعدية Basophil، خلية حمضية Eosinophil والتي سميت حسب تلون كل منها ويمكن تكوينها: تتكون في نخاع العظام الأحمر
- **غير المحببة Non-granular leukocytes:** تتميز هذه الكريات البيضاء بغياب الحبيبات في الساييتوبلازم، مكان تكوينها: تتكون في الأنسجة الليمفاوية كالتحال والكبد والغدد الليمفاوية

وتقسم الحبيبية {Granulocytes} الى ثلاثة أقسام وهي:

1- الخلايا المتعادلة Neutrophil: حيث تكون ما يقرب من نصف خلايا الدم البيضاء ، وهى عادة أول الخلايا التى تتعرض للاستجابة فى الجهاز المناعي ضد البكتيريا أو فيروس، وتقوم بإرسال إشارات تنبه الخلايا الأخرى في جهاز المناعة للرد على الجسم الغريب، حيث يتم إنتاج حوالي 100 مليار من هذه الخلايا كل يوم.

2- الخلايا الحمضية Eosinophil: تلعب أيضاً دوراً مهماً في مكافحة البكتيريا وهي مهمة جداً في الاستجابة للعدوى ضد الطفيليات كما أن لها دور فى رد الفعل التحسسى تجاه الأشياء، تمثل فقط 1% من خلايا الدم البيضاء في مجرى الدم ولكنها موجودة في تركيزات عالية في الجهاز الهضمي.

3- الخلايا القاعدية Basophil: تمثل 1% من خلايا الدم البيضاء ، دورها مهم في الاستجابة المناعية لمسببات الأمراض.

أما غير الحبيبية Non-granular leukocytes

1- الخلايا الليمفاوية Lymphocyte: وهى الخلايا المسؤولة عن قتل الأجسام الغريب في الجسم.

2- الخلايا الوحيدة Monocyte: هي التي تنتج الأجسام المضادة للعدوى ، كما أنها تدخل فى غالبية اللقاحات الحالية

[(PLT) Platelets]

3- الصفائح الدموية

تدعى ايضاً (Thrombocytes) وهي من مكونات الدم الرئيسية تنتج من قبل الخلايا الضخمة النواء (Megakaryocytes) الموجودة في نخاع العظم، والصفائح ليست خلايا بل هي أجزاء من الساييتوبلازم وهي ذات شكل غير منتظم وتكون خالية من النواة. قطرها يتراوح بين 2-3 ميكرون، وعمرها يكون بين 5-9 أيام، ويتم إزالة الصفائح الهرمة والميتة بواسطة الخلايا البلعمية Macrophages في الطحال أو الكبد، المعدل الطبيعي للصفائح الدموية 150000-400000 صفيحة لكل مايكرو ليتر من الدم، وتعمل في المقام الأول على عملية الارقاء (Heamostasis) حيث تجتمع في منطقة قطع الاوعية الدموية وتعمل كسدادة لاييقاف النزف، كما أنها تشارك في إصلاح الانسجة والدفاع عن الجسم ضد الميكروبات. يقل تركيز الصفائح الدموية بسبب انخفاض إنتاج هورمون الثرومبوبايوتين من الكبد Thrombopoietin (المادة المنشطة لتكوين خلايا التجلط أو الصفائح الدموية)، ويؤدي نقصانها الى عدم تكون الخثرة الدموية الضرورية لاييقاف النزف عند حدوث الجرح، ومن ثم لا يحدث توقف للنزيف حتى وأن كان الجرح بسيط فيمكن أن يؤدي النزيف لفترة طويلة الى فقدان كمية كبيرة من الدم تجعل حياة المريض في خطر (Campbell، 2008)، أما اذا كان عدد الصفائح الدموية مرتفعة، عندها تتكون الخثرة الدموية التي قد تعيق تدفق الدم في

الأوعية الدموية وتؤدي مثل هذه الأحداث الى السكتة الدماغية أو احتشاء عضلة القلب أو الانسداد الرئوي وكذلك انسداد الأوعية الدموية.

تحضير أغشية الدم على الشرائح reparation of Blood Films on Slides

يجب عمل أغشية الدم على شرائح زجاجية نظيفة. تتميز الأفلام التي يتم تصنيعها على أغشية الزجاج بمزايا لا تُذكر ولا تُناسب الممارسات المعملية الحديثة. قد تنتشر الأفلام باليد أو عن طريق مفرشة منزقة آلية ، تكون الأخيرة إما أداة قائمة بذاتها أو مكوناً من عداد خلايا الدم الآلي.

Manual Method

الطريقة اليدوية

يتم تحضير مسحة الدم blood films من الدم الطازج بدون إضافة مضادات التخثر anticoagulant أو من الدم الخالي من (EDTA) Ethylenediaminetetra-acetic ، يجب عدم استخدام الهيبارين بشكل عام لأن الخصائص الصبغية تختلف عن تلك الخاصة بالدم المضاد للتخثر EDTA ، يتم اصنع الأفلام الجيدة ، باستخدام شرائح نظيفة ، وخالية من الغبار قبل الاستخدام مباشرة. يجب أن يكون قياس الشرائح 76*25 mm وسمكها 1 mm تقريباً ؛ من الناحية المثالية يجب أن تكون متجمدة في نهاية واحدة لتسهيل وضع العلامات ، ولكن هذه أكثر تكلفة.

أنواع فلم الدم Types of Blood Film

أولاً : نوع رفيع

ثانياً: النوع السميك : يتم إعداده للكشف عن طفيليات الدم مثل الملاريا.

Three Basic Steps To Make Blood Film

ثلاث خطوات

أساسية لعمل فيلم الدم:

1- تحضير الدم. Preparation of Blood.

2- تثبيت غشاء الدم Fixation of Blood Film

3-تلطيخ غشاء الدم Staining of Blood Film

(Material)

❖ المواد المستخدمة

- الشرائح المجهرية نظيفة (السلاليد الزجاجي).
- قفازات يمكن التخلص منها.
- مجموعة جمع الدم الشعري (أنسجة أو شاش ، مسحات كحولية ، إبر معقمة).

- ماصة أوتوماتيكية pipette .
- ماء نظيف (ماء الصنبور)
- المؤقت.
- الصبغات
- الكحول
- مؤشر لكتابة اسم المريض
- ورقم السلايد
- المجهر ، الهدف x100.

Preparation of Blood

تحضير الدم

- 1- جمع العينة الدم
2. وخز الإصبع
3. وضع العينة الدم في EDTA tube (خلال ساعة واحدة من الجمع).

طريقة تحضير الدم. Preparation of Blood.

1. نأخذ حوالي 3 أو 4 من شرائح زجاجية نظيفة.
2. نأخذ قطرة من عينة دم للمريض.
3. ضع قطرة الدم هذه على بعد حوالي 1 سم من الحافة الضيقة للشريحة.
4. ضع الشريحة على سطح مستو



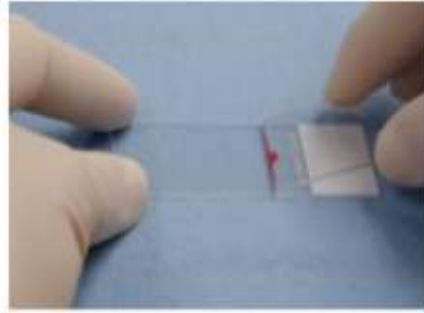
شكل رقم (2-4) وضع قطره من الدم على سلايد

5. باستخدام يدك اليمنى تضع الحافة النظيفة للشريحة الثانية (شريحة الموزعة)، أمام قطرة الدم

6. أمسك شريحة الموزعة بزاوية 40^0 أو 45^0 ، ثم اسحبها مرة أخرى مقابل قطرة الدم. (تحكم في سمك اللطخة عن طريق تغيير زاوية شريحة الموزعة).

7. اسحب الموزعة للخلف برفق حتى تلامس الجزء الأمامي من قطرة الدم. أمسكها هناك ، أو حركها قليلاً من جانب إلى آخر ، واسمح للدم بالانتشار تقريباً إلى حواف الشريحة.

Changing the angle of spreader slide)



شكل رقم (3-4) توزيع قطره الدم

8. ادفع الموزعة للأمام بحركة خفيفة وسلسة



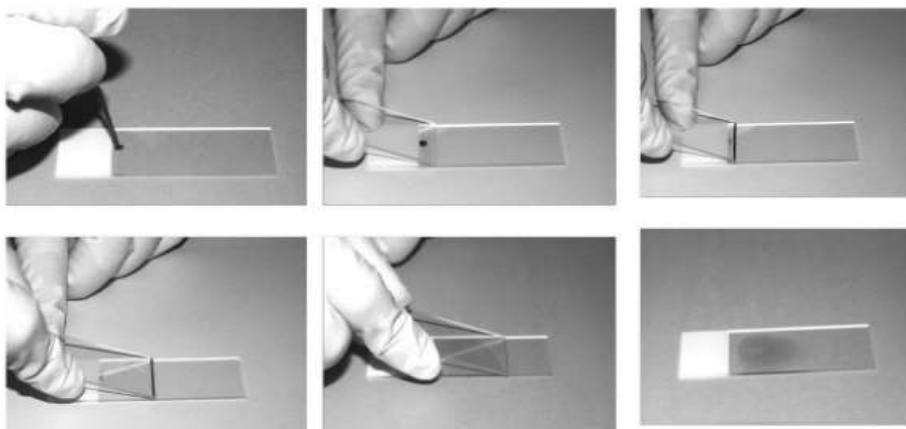
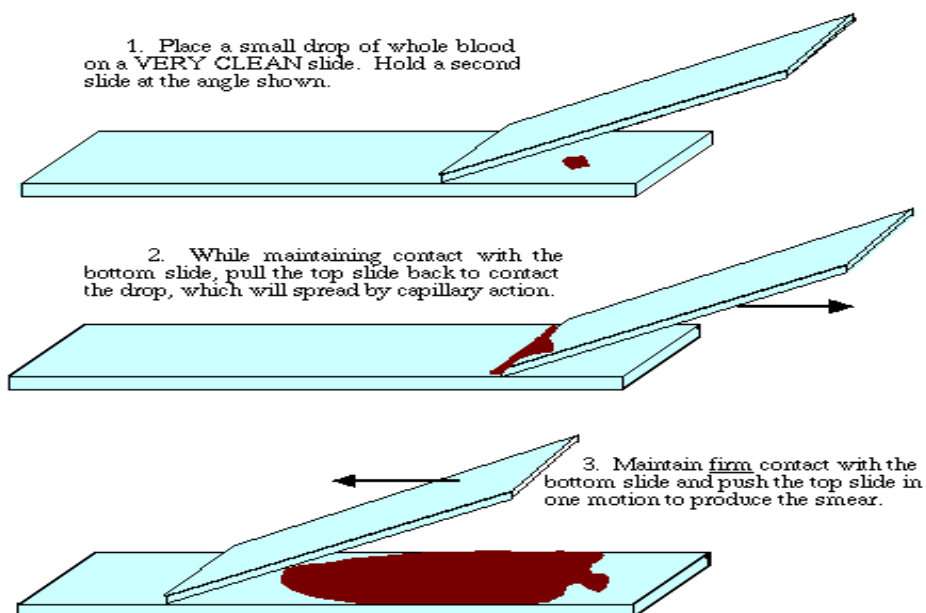
شكل رقم (4-4) ندفع الموزع بحركة خفيفة

9. ستبقى طبقة الرقيقة على شكل لسان او رصاصة



شكل رقم (4-5) طبقة رقيقة على شكل لسان

10. اترك طبقة الدم تجف تمامًا قبل التلوين. (لا تنفخ حتى تجف ، التنفس الرطب يسبب قطعة أثرية في كرات الدم الحمراء).



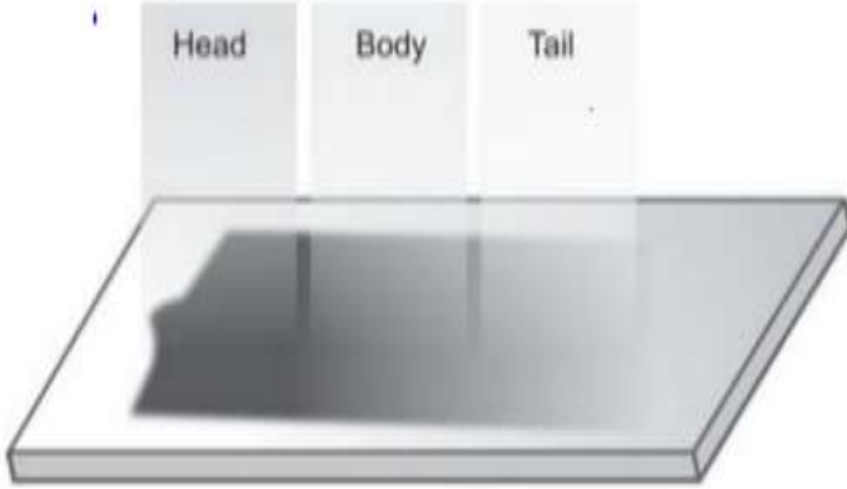
شكل (4-6) طريقة عمل مسحة الدم

يتكون فيلم الدم من ثلاثة أجزاء:

الرأس: جزء من غشاء الدم بالقرب من قطرة الدم.

الجسم: الجزء الرئيسي من غشاء الدم.

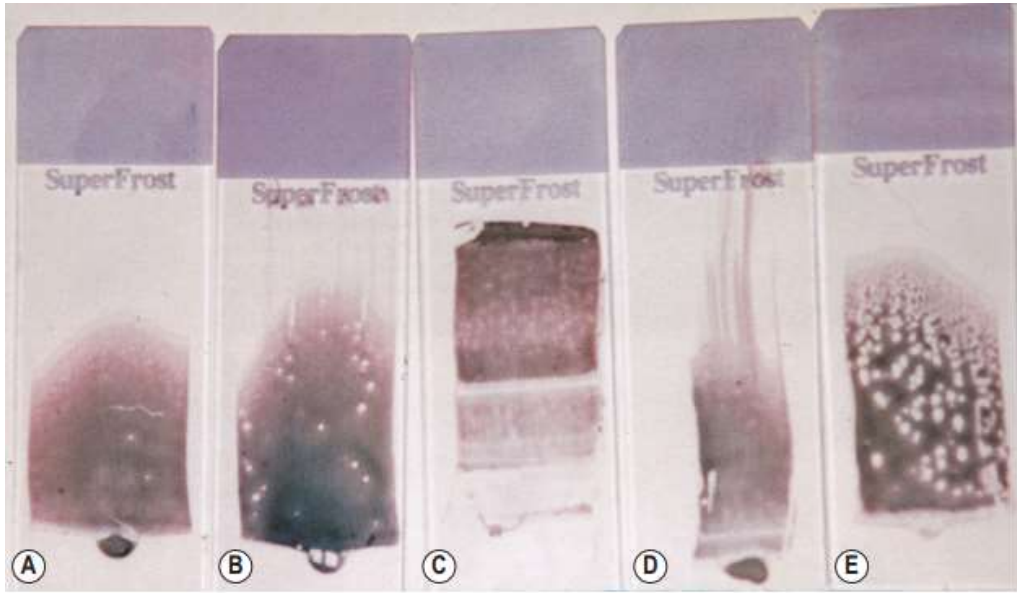
الذيل: النهاية الأخيرة لفيلم الدم.



شكل رقم (4-7) شكل سلايد الدم

2- تثبيت غشاء الدم *Fixation of Blood Film*

التثبيت هو العملية التي تجعل طبقة الدم والخلايا تلتصق بالشريحة الزجاجية. ويعمل على الحفاظ على مورفولوجيا الخلايا أي (شكلها) ، ويجب عدم ترك الأفلام بدون تثبيت لأكثر من بضع ساعات يتم إرسال الأفلام إلى المختبر عن طريق البريد ، فمن الضروري تجفيفها وتثبيتها جيدًا قبل إرسالها



الشكل (4-8) أفلام الدم على الشرائح

- (A) فيلم جيد الصنع
 (B) فيلم غير منتظم غير مكتمل على شريحة متربة.
 (C) فيلم سميك للغاية.
 (D) فيلم تم نشره بضغط غير متناسق واستخدام مفرشة ذات حواف غير منتظمة ، مما يؤدي إلى ذيول طويلة.
 (E) فيلم مصنوع على شريحة دهنية للغاية..

3- تلوين غشاء الدم: (التصبيغ) *Staining of Blood Film*

عملية تلوين النوى والسيتوبلازم للخلايا. تم تحقيق كلتا العمليتين بواسطة صبغة ليشامانا.

هناك أنواع مختلفة من البقع حسب الحاجة

- 1-Leishmans stain .
- 2- Gimesa stain .
- 3- wright stain .
- 4-jenner stain .

Romanowsky Dyes

Leishman's Stain

نزن 0.2 غرام من الصبغة المسحوقة ، وتحويلها إلى قارورة مخروطية بسعة 200-250 مل. أضف 100 مل من الميثانول وقم بتسخين الخليط إلى 50 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة ، وأرجه من حين لآخر. دع القارورة تبرد وتصفية المحلول. ثم يصبح جاهزاً للاستخدام ، ولكنه سيحسن من وضعه.

Giemsa's Stain

تزن 1 غرام من الصبغة المسحوقة وتحويلها إلى قارورة مخروطية بسعة (200-250) مل. أضف 100 مل من الميثانول وقم بتسخين الخليط إلى 50 درجة مئوية ؛ يحفظ عند درجة الحرارة هذه ، احتفظ عند درجة الحرارة هذه لمدة 15 دقيقة مع اهتزاز من حين لآخر ، ثم قم بتصفية الحل ، ثم يصبح جاهزاً للاستخدام ، ولكنه سيتحسن في الوقوف لبضع ساعات

wright stain .

عبارة عن صبغة للأنسجة وتسمح للتمييز بين خلايا الدم . التي ترى تحت المجهر تستخدم بصورة كبيرة لصبغ شرائح الدم ونقي العظم . وتستخدم أيضاً لصبغ الصبغي (chromosome)

Jenner's Stain

قم بتحضير محلول 5 غم / لتر في الميثانول بنفس الطريقة تماماً كما هو موضح سابقاً لصبغة مايو - جرونوالد. May-Gruenwald Stain

تلطيخ فيلم الدم:

بعد 2-3 دقيقة ، أضف كمية متساوية من البفر (pH 6-8) واخلطها مع البقعة برفق. اترك الخليط على الشريحة لمدة 10-15 دقيقة. اسكب البقعة واغسل الشريحة بالماء برفق. ضع الشريحة في النهاية ودعها تجف في الهواء.

References :

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. and Kelley, R.O. (2006). Basic Histology. A Lange Medical Book. Appleton and Lange, 7: 72-125.

Machlus, K.R. ; Thon, J.N. and Italiano, J.E. (2014). Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte : A review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation . Brit. J. of Hematol. , 165(2) : 227-236.

Tulloch-Reid, M.K.; Hanson, R.L.; Saremi, A.; Looker, H.C.; Williams, D.E. and et al. (2004). Hematocrit and the incidence of type 2 diabetes in the pima indians. *Diabetes Care*, 27(9): 2245-2246.

Dacie, J.V. and Lewis, S.M. (2002). *Practical Hematology* Churchill. 9th ed Edinburgh.

Shahad Qasim Mohammed AL-Hamadiny(2018): Study of some physiological and biochemical Parameters of Hemophilia A and Von Willebrand patients in Wasit Province. MSc.Thesis.collage of science-university of Wasit.

السيرة الذاتية والعلمية



م.م شهد قاسم محمد الحمداني
ماجستير .مدرس مساعد
قسم علوم الحياة، كلية العلوم ،جامعة واسط ، العراق

المعلومات الشخصية

• الاسم	م.م شهد قاسم محمد
• المواليد	1991/5/29
• مكان الولادة	واسط، العراق
• الجنس	أنثى
• الجنسية	عراقية
• الحالة الزوجية	عزباء
• عدد الأطفال	١
• رقم الهاتف الجوال	07725060098

المعلومات الأكاديمية

• اللقب العلمي	مدرس مساعد
• القسم العلمي	قسم علوم الحياة، كلية العلوم ،جامعة واسط
• التخصص العام	علم الحيوان
• التخصص الدقيق	علم أمراض الدم – فسلجه حيوان
• البريد الإلكتروني	Sahadqasim91@gmail.com Shahad.qasim@alkutcollege.edu.iq
• بوابة البحث العلمي	https://www.researchgate.net/profile/adnan_mosa

التحصيل الدراسي

الشهادة	السنة	التخصص	الجهة المانحة
• ماجستير	2017	علوم حيوان	كلية العلوم – جامعة واسط- العراق
• بكالوريوس	2012	قسم علوم الحياة	كلية العلوم – جامعة واسط- العراق

الألقاب العلمية

• مدرس مساعد	2018 / 11 / 1
-----------------	---------------

الفصل الخامس

الفحص المباشر لعينات الطفيليات

م.م نور نعيم شاكر محمود

عند التحدث عن الفحص المختبري للطفيليات لابد لنا أولاً من معرفة كيفية جمع العينات وماهي العينة ومن اين ممكن الحصول عليها وماهي الصبغة المناسبة وتركيزها

يجب ان يؤخذ بنظر الاعتبار في المختبر يجب التعامل مع جميع العينات الطازجة بعناية ، حيث تمثل كل عينة مصدرًا محتملاً للمواد المعدية (البكتيريا والفيروسات والفطريات والطفيليات). يجب أن تتضمن احتياطات السلامة والوعي بما يلي: وضع العلامات الصحيحة للمثبتات ؛ مناطق محددة مخصصة للتعامل مع العينات ، حاويات مناسبة للطرء المركزي ؛ اماكن وطرق سليمة للتخلص من العينات بعد الفحص والتشخيص.

عينات البراز Stool Examination

لابد من أن يركز كل فحص طفيلي على ركيزتين:

- الفحص الظاهري Examination Macroscopic هيئة البراز فحص العياني وهذا يتم بمشاهدة لون وقوام هيئة البراز كلها لها دلالات معينة.

-الفحص المجهرى Examination Microscopic.

سنسلط الضوء حول الفحص المجهرى لكونه مهم من الناحية المختبرية ولكن قبل التطرق للفحص يجب معرفة كيفية جمع وحفظ العينة والمواد المستخدمة في ذلك

يجب جمع عينات البراز في حاويات نظيفة وواسعة. غالبًا ما يتم اختيار وعاء بلاستيكي بسعة 0.5 pt (حوالي 0.24 لتر) مع غطاء محكم لهذا الغرض. إن ملائمة الغطاء مهم بشكل خاص ، سواء من ناحية الانسكاب العرضي ومن أجل الحفاظ على الرطوبة داخل العينة. يجب أن لا تكون العينات ملوثة بالماء أو البول ، لأن الماء قد يحتوي على كائنات حية يمكن أن يخلط بينها وبين الطفيليات البشرية والبول قد يدمر الكائنات المتحركة.

- حفظ العينات Preservation of Specimens

هناك عدد من الأسباب التي قد تؤدي إلى تأخر الوقت من وقت مرور العينة حتى الفحص في المختبر (على سبيل المثال ، عبء العمل في المختبر أو مسافة العبور أو الوقت الذي تصل فيه العينة إلى المختبر). للحفاظ على مورفولوجيا الطفيليات ولمنع التطور المستمر لبعض بيض اليرقات واليرقات ، يمكن وضع عينات البراز في المواد الحافظة فوراً بعد مرورها (بواسطة المريض باستخدام مجموعة أدوات) أو بمجرد استلام المختبر للعينة. هناك العديد من المثبتات المتاحة ؛ الأكثر شيوعاً ، بما في ذلك الفورمالين ، ميرثيولات (ثيميروسال) - اليود فورمالين (MIF) ، أسيتات الصوديوم ،

حمض الخليك - الفورمالين (SAF) ، سائل شاودين ، كحول البولي فينيل (PVA) ناخذ بعض من انواعها.

المواد الحافظة Preservatives

• Formalin الفورمالين

استخدام الفورمالين لسنوات عديدة كمثبت لجميع الأغراض وهو مناسب لبيض اليرقات واليرقات وللأكياس الأولية ، والبيضية ، والجراثيم. يستخدم تركيزان بشكل شائع: 5٪ ، يُنصح به للحفاظ على كيسات الأوالي ، و 10٪ ، الموصى به لبيض اليرقات واليرقات. على الرغم من أن 5٪ غالبًا ما يوصى به للاستخدام لجميع الأغراض ، فإن معظم الشركات المصنعة التجارية توفر 10٪ ، وهو على الأرجح يقتل جميع بيض الديدان الطفيلية. التحضير الأكثر شيوعًا للفورمالين هو 10٪ فورمالين ، على النحو التالي

الفورمالديهايد Formaldehyde

100 ml (or 50 ml for 5%) (USP)

Saline solution محلول ملحي

NaCl 900 ml (or 950 ml for 5%) %0.85

تخفيف 100 مل من الفورمالديهايد مع 900 مل من محلول كلوريد الصوديوم بنسبة (%0.85)

(يمكن استخدام الماء المقطر بدلاً من المحلول الملحي)

إذا كنت تريد استخدام buffered formalin، فإن الطريقة الموصى بها هي مزج 6.10 غم من Na_2HPO_4 و 0.15 غم من NaH_2PO_4 وتخزين الخليط الجاف في زجاجة مغلقة بإحكام. حضر لترًا واحدًا إما من 10 أو 5٪ فورمالين ، وأضف 0.8 غم من خليط الملح العازلة.

• المادة الحافظة MIF

مادة حافظة جيدة لتصبغ لمعظم أنواع ومراحل الطفيليات الموجودة في البراز. مفيد بشكل خاص للمسوحات الميدانية. يتم استخدامه مع جميع أنواع البراز والرشف الشائعة؛ يمكن تشخيص البروتوزوا والبيض واليرقات دون مزيد من التصبغ في التركيبات الرطبة المؤقتة ، إما بعد التثبيت مباشرة أو تحضيرها بعد عدة أسابيع. على الرغم من أن بعض المختبرات تؤكد أنه يمكن تحضير عينة مصبغة دائمة من عينات محفوظة في MIF ، فإن معظم المختبرات التي تستخدم مثل هذا المثبت لا تفحص المواد إلا كمحضر رطب (التصبغ المباشرة و / أو الرواسب المركزة).

يتم تحضير المادة الحافظة MIF في محلولين ، يتم تخزينهما بشكل منفصل وخطهما مباشرة قبل الاستخدام

المحلول الأول (المخزن في زجاجة بنية)

ماء مقطر 50 مل

فورمالدهايد (USP) 5 مل

Thimerosal (صبغة)

ميرثيولات (1:1000) 40 مل

جلسيرين 1 مل

المحلول الثاني (محلول Lugol) (جيد لعدة أسابيع في زجاجة بنية اللون مسدودة بإحكام)

ماء مقطر 100 مل

بلورات يوديد البوتاسيوم (KI) 10 غم

بلورات اليود (تضاف بعد إذابة KI) 5 غم

اجمع 9.4 مل من المحلول الأول مع 0.6 مل من المحلول الثاني قبل الاستخدام.

1. أضف حوالي ربع ملعقة صغيرة (1 غم) من البراز الطازج إلى المحلول ، واخلطها ، يجب أن تكون المادة البرازية لينة إذا كان من المقرر إجراء تعداد البيض لاحقًا .

2. في غضون 24 ساعة ، في حالة هدوء للعينة ، تشكل العينة ثلاث طبقات محددة جيدًا. تتكون الطبقة العليا ، وهي سائل برتقالي واضح ، بشكل رئيسي من الفورمالين والميروليولات والماء. لا يحجز البيض أو الأوليات protozoa . الواجهة عبارة عن طبقة سمكية ، برتقالية شاحبة أو صفراء كريمية ، عادة بسماكة 1 إلى 2 مم ؛ قد تحصر هذه الطبقة بعض بيض الأوليات protozoa والديدان الطفيلية. تتكون الطبقة السفلية من جزيئات ذات صبغة أعمق. تم العثور على البيض والأوليات protozoa في جميع أنحاء هذه الطبقة.

3- باستخدام ماصة زجاجية ، يمكن عمل مسحات MIF المباشرة من كل من الواجهة والطبقات السفلية. يتم الحصول على أفضل النتائج عن طريق عمل اللطاخات من الطبقتين.

• Schaudinn's Fluid سائل شاودين

تم تصميم سائل Schaudinn لاستخدامه مع عينات البراز الطازجة أو العينات من سطح الغشاء المخاطي المعوي. غالبًا ما تختار العديد من المختبرات التي تتلقى عينات من المرضى الداخليين (لا توجد مشكلة في أوقات التسليم) هذا النهج. يتم بعد ذلك

تحضير مسحات مصبغة دائمة من مواد ثابتة. تتوفر أيضًا تقنية تركيز لمادة Schaudinn المحفوظة للسوائل ولكن لا يتم استخدامها على نطاق واسع.

كلوريد الزئبق ، محلول مائي مشبع

كلوريد الزئبق 110 g Mercuric chloride (HgCl₂)

الماء المقطر 1000 مل Distilled water.....

استخدم الكأس كحمام مائي ؛ يغلي حتى يذوب كلوريد الزئبق ؛ دعه يقف لعدة ساعات حتى تشكل البلورات.

ثبت Schaudinn's Fixative (Stock Solution)

كلوريد الزئبق المشبع

محلول مائي 600 مل

الكحول الإيثيلي ، 95% 300 مل

قبل الاستخدام مباشرة ، أضف 5 مل من حمض الأسيتيك الجليدي لكل 100 مل من محلول المخزون (Stock Solution).

- فحص عينات البراز مجهريا Microscopic Examination

يتكون الفحص المجهرى لعينة البراز ، والتي تسمى عادةً فحص البويضات والطفيليات ، من ثلاث تقنيات منفصلة: اللطخة الرطبة المباشرة the direct wet smear ، والتركيز concentration ، واللطخة المصبغة الدائمة permanent stained smear. تم تصميم كل من هذه الأساليب لغرض معين وتشكل جزءًا لا يتجزأ من الفحص الكلي. هنا سنسلط الضوء حول التشخيص المباشر للعينة (مسحة) وتصبيغا وكل الاجراء المتعلقة بالفحص.

• المسحة المباشرة الرطبة Direct Wet Smear

وهذه تكون مباشرة عند استلام العينة طازجة وهي استخدام المحلول الملحي (Saline) دائما ما نستخدمه اولا لإثبات الحركة المميزة للأميبات والسوطيات . بالإضافة رؤية الخلايا الحمراء و تروفوزويت من الأميبا وهذا يدل على الإصابة Entamoeba histolytica. يمكن العثور على هذه الكائنات الحية في البراز الطازج ، أو في بعض الأحيان في المخاط الدموي الملتصق بسطح البراز.

❖ طريقة الفحص هذه تحضر بمزج كمية من قليلة من البراز (حوالي 2 ملغم) مع قطرة من NaCl (0.85%) ويتم خلطها جيدة بواسطة العصا الخشبية، اخذ شريحة زجاجية slid ونضع فوقها عينة البراز بواسطة العصا الخشبية ويجب اخذ نماذج من عدة اجزاء من العينة اثناء الفحص (يؤخذ 3 اجزاء من عينة) للتأكد الفحص وشمولة. هنا يتم رؤية الاطوار الخضرية الحية وملاحظة حركتها .وفي بعض الاحيان يستخدم

مثبت اليود المائي حيث يقتل الكائنات الحية ولكن يستعمل لغرض رؤية الاكياس والبيوض

❖ ملاحظة: العينة السمكية اكثر من 2 ملغم هنا لاتكون القراءة دقيقة للشريحة اما فيما اذا أي عينة أقل من 2 ملغم ينتج عنها فحص معلق رفيع للغاية ، مما يقلل من فرص العثور على الكائنات الحية.

❖ يجب فحص البراز الحاوي على الدم أو المخاط دائماً مباشراً.

❖ يستحسن أن يبدأ فحص العينة تحت الميكروسكوب بالعدسة الشيئية وقوة تكبير $\times 10$ حتى يتم مسح الشريحة كلها فإذا وجدت بويضات اشتبه فيها يتم الفحص بالعدسة الشيئية $\times 40$. استخدام العدسة الزيتية لا يوصى بها بشكل روتيني ما لم يكن غطاء الشريحة (coverslip) مغلقة بإحكام على الشريحة.

▪ لرؤية البيوض ناخذ شريحة الزجاجية slid ونضع عليها بقعة اليود (قطرة بنسبة 1٪ من اليود في 2٪ من يوديد البوتاسيوم) الممزوج مع تعليق البراز في محلول ملحي تسهل التعرف على الأكياس الأولية protozoan cysts ، ولكنها تقتل وتشوه التروفوزويت (الطور الخضري المتحرك). (استخدام اليود يصبغ البيوض ممايسهل رؤيتها) .

❖ تحضير محلول ملحي (0.85% NaCl) Saline

كلوريد الصوديوم 0.85 غم

ماء مقطر..... 100.0 مل

1. اذابة كلوريد الصوديوم في الماء المقطر في ورق أو زجاجة ، باستخدام المحرك المغناطيسي (magnetic stirrer) المتوفر بالمختبر .

2. يوزع 10 مل في كل من 10 أنابيب ذات غطاء لولبي.

3. تسمية 0.85٪ كلوريد الصوديوم مع تاريخ انتهاء الصلاحية سنة واحدة.

4. تعقيم بواسطة الموصدة (autoclaving) عند 121 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة.

5. عندما تبرد ، تخزن في 4 درجات مئوية.

صبغة اليود:

صبغة اليود أو التركيب الرطب هو طريقة قياسية أخرى للفحص. يتم استخدام إما يود Lugol المخفف (5 غم من اليود و 10 غم من يوديد البوتاسيوم و 100 مل من الماء المقطر) أو محلول اليود Dobell و O'Connor (1 غم من اليود و 2 غم من يوديد البوتاسيوم و 50 مل من الماء المقطر). يساعد اليود على تأكيد هوية الأكياس ، حيث أنه يصبغ بشكل واضح فجوات ونوى الجليكوجين . اكياس الاوليات المصبغة باليود تشاهد تصبغ السيتوبلازم بالأصفر الذهبي ومواد الجليكوجين تكون بني ونوى الباهتة. تحضير اليود D'Antoni's Iodine

يوديد البوتاسيوم 1.0 غم

بلورات اليود المسحوق. 1.5 غم

ماء مقطر 100.0 مل

1. تذويب يوديد البوتاسيوم وبلورات اليود في الماء المقطر في قارورة أو زجاجة باستخدام المحرك المغناطيسي

2. يجب أن يكون محلول يوديد البوتاسيوم مشبع مع اليود ، مع ترك بعض البلورات الزائدة على قاع الزجاجة.

3. قم بتخزينها في زجاجة ذات غطاء مسدود بإحكام والزجاج بني في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام.

4. هذا المحلول اصبح جاهز للاستخدام الفوري.

ضع علامة على أن اليود D'Antoni مع تاريخ انتهاء الصلاحية لسنة واحدة (يبقى محلول المخزون جيداً طالما بقي فائض من بلورات اليود في قاع الزجاجة).

5. قسّم بعض اليود إلى قطارة بنية . يجب أن يكون لمحلول العمل لون قوي ويجب التخلص منه عند تفتيح اللون (عادةً خلال 10 إلى 14 يوماً). يجب ان يحفظ في مكان مظلم وعندما يبد لون قوي بالتلاشي يجب استبداله بشكل دوري.

Lugol's Iodine

يوديد البوتاسيوم 10.0 غم

بلورات اليود المسحوق 5 غم

ماء مقطر 100.0 مل

1. اتبع التوجيهات المذكورة أعلاه بخصوص D'Antoni's اليود ، بما في ذلك تاريخ انتهاء الصلاحية لسنة واحدة.

2. تمييع جزء 1: 5 بالماء المقطر للاستخدام الروتيني

3. ضع محلول العمل هذا في قطارة بنية . يجب أن يكون محلول العمل بني قوي اللون ويجب التخلص منها عندما اللون يخفف (عادةً خلال 10 إلى 14 يوماً).

Eosin staining صبغة الايوسين

يستخدم محلول الايوسين بتركيز 1 % لتصبغ عينة البراز الرطبة حيث يتم تصبغ كل من التروفوزويت واكياس الابتدائيات وكذلك يرقات الديدان الطفيلية والبيض ذو الجدران الرقيقة تبرز كأجسام بيضاء لؤلؤية على خلفية وردية ويمكن اكتشافها بسهولة. يمكن رؤية أجسام الكروماتويد ونوى الأكياس الأميبية بشكل بارز. كما نرى فعالية الايوسين

في تصبغ الاكياس حيث يشاهد الاكياس الحية غير مصبغة اما الاكياس الميتة تاخذ اللون الوردي .يستدل به على الاكياس الحية

Nair's Buffered Methylene Blue Stain for Trophozoites **(Direct Smear) صبغة المثلين الزرقاء لتصبغ الطور الخضري التروفوزويت** **(مسحة مباشرة)**

على الرغم من عدم استخدامها بشكل شائع ، يعتبر صبغة نير Nair's الميثيلين الزرقاء البفر فعالة في إظهار التفاصيل النووية في مراحل trophozoite عند استخدامها عند درجة حموضة منخفضة ؛ يسمح نطاق الأس الهيدروجيني من 3.6 إلى 4.8 باختراق أكثر نشاطاً للصبغة في الكائن الحي . بعد 5 إلى 10 دقائق ، تكون السيتوبلازم ملطخة باللون الأزرق الشاحب ، وتكون النواة زرقاء داكنة ؛ يجب فحص الشريحة في غضون 30 دقيقة. عادةً ما يعطي أزرق الميثيلين (0.06٪ في محلول أسيتات بدرجة حموضة 3.6) نتائج مرضية.

Acetate Buffer Solution Stock Solution A (0.2 M)

11.55 مل CH_3COOH حمض الخليك

1000.0 مل ماء مقطر

Acetate Buffer Solution Stock Solution B (0.2 M)

16.4 غم $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ خلات الصوديوم

او

Sodium acetate أسيتات الصوديوم

27.2 غم $(\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$

1000.0 مل ماء مقطر

امزج كمية محاليل الخام A و B الموضحة في الجدول التالي وقم بتخفيفها بالماء المقطر إلى إجمالي 100 مل.

Desired pH	Stock solution A (ml)	Stock solution B (ml)
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5

- التصبغ الدائم للمسحة Permanent Stained Smears

ان الغرض من هذه الطريقة هي لحفظ الشرائح الزجاجية المثبتة والمصبغة دون الحاق الضرر بالطيفي لفترات طويلة لغرض اجراء بحث او لاغراض تعليمية.

عادة مايتم تحضير المسحات الدائمة من عينات البراز الطري مباشرة او المحضر بطرق التركيز او المحفوظ بالاحدى مواد الحفظ والتثبيت بعمل مسحة خفيفة على شريحة زجاجية نظيفة و ثم نتركها لتجف بالهواء ونستخدم كحول الميثانول لغرض التثبيت بعدما يجف الكحول يتم التصبغ بالاحدى الصبغات الدائمة مثلا لتصبغ الابتدائيات تستخدم Trichrome stain و لتصبغ oocysts، Cryptosporidium يستخدم صبغة Modified zeihl –neelson و لتصبغ الابتدائيات تستخدم صبغة Gemisa . ان المسحات الدائمة يعاد فحصها عادةً تحت العدسة الزيتية {X100}.

• إن التأكد من صحة وجود intestin al protozoan ، لكل من الطور الخضري trophozoites والاكياس cysts، هو الغرض الأساسي من هذه التقنية.

• البويضات واليرقات الديدان الطفيلية تستهلك الكثير من الصبغة وعادة لا يمكن التعرف عليها.

• يمكن تحضير المسحات الدائمة باستخدام عينة براز طازجة وبولي كحول (polyvinyl) alcohol محفوظ.

• الطريقتان اللتان تستخدمان بشكل شائع هما:

(1) صبغة الحديد الكيماوية iron-hematoxylin stain الطريقة القديمة والاكثر صعوبة

و (2) صبغة ويتلي ثلاثية الألوان. (Wheatley's trichrome stain).

طريقة عمل التصبغ ب iron-hematoxylin stain

1. يتم تثبيت مسحة البراز على شريحة في محلول Schaudinn لمدة 15 دقيقة ويتم غمرها على التوالي لمدة 2-5 دقائق في 70٪ كحول ، 70٪ كحول يحتوي على أثر من اليود trace of iodine ، ثم 50٪ كحول لمدة 2-5 دقائق.
2. يُغسل في الماء لمدة 5 - 10 دقائق ويُغمس في محلول كبريتات الأمونيوم (ferric ammonium sulfate solution) المائي بنسبة 2٪ لمدة 5 - 15 دقيقة.
3. يتم غسله مرة أخرى في الماء لمدة 3-5 دقائق ويتم تلوينه بنسبة 0.5٪ من الهيماتوكسيلين المائي (hematoxylin) لمدة 5 - 15 دقيقة.
4. يُغسل لمدة 2-5 دقائق ويُفرق في محلول مائي مشبع لحمض بيكريك picric acid ((لمدة 10-15 دقيقة.
5. ثم يتم غسلها لمدة 10-15 دقيقة وتجفيفها من خلال المرور من خلال زيادة قوة الكحول ، وتطهيرها في التولوين أو الزايلول (toluene or xylol) و mounted .

2. صبغة Trichrome (طريقة ويتلي)

- تقنية Trichrome الخاصة بـ Wheatley لعينات البراز هي تعديل أو تحويل طريقة صبغة Gomori's original للأنسجة.
- هي أسرع وأبسط طريقة ، ويتم تثبيت المسحة في محلول Schaudinn's solution وتمريضها تكراراً في كحول .
- بعد ذلك يتم تطبيق صبغة الترايكروم (light green SF⁺chromotrope 2R ، ((phosphotungstic acid in glacial acetic acid and distilled waler لمدة 5-10 دقائق ، متباعدة في حمض الكحوليات المجفف ، ومسح ومثبت.

تعديل صبغة الترايكروم (Trichrome) المعدلة لتشخيص microsporidia :

تعتمد طريقة التصبغ هذه على حقيقة أن اختراق بقعة microsporidia spore صعب للغاية ، وبالتالي يتم استخدام الصبغة في chromotrope 2R أكثر من تلك المستخدمة بشكل روتيني لإعداد تعديل Wheatley's لطريقة Trichrome ووقت التصبغ أطول بكثير (90 دقيقة). يتم استخدام تقنيات تصبغ أخرى لأغراض خاصة. على سبيل المثال modified acid-fast أو Giemsa stain يستخدم للكشف عن البويضات من Cryptosporidium و Isospora.

Modified Ziehl-Neelsen (acid-fast) stain (hot method)

قد يكون من الصعب الكشف عن البويضات من Cryptosporidium و Isospora في عينات البراز ، دون تصبغ خاص. يوصى باستخدام Modified acid-fast لإثبات أو وصف هذه الكائنات الحية. يساعد تطبيق الحرارة على الكاربوفوكسين (carbolfuchsin) في تصبغ واستخدام مزيل اللون المعتدل (5٪ حمض الكبريتيك) مما يسمح للكائنات الحية بالاحتفاظ بالمزيد من لونها الوردي - الأحمر.

فحص الطفيليات في الدم Examination of Blood

بجانب البراز ، يوجد أكبر عدد من الطفيليات في الدم. فحص الدم هو طريقة التشخيص الروتينية في الملاريا malaria، داء الفيلاريات filariasis، داء المثقبيات الأفريقي African trypanosomiasis وداء babesiosis.

1- الفحص المباشر للدم:

تستخدم هذه الطريقة لتشخيص وجود الطفيليات التي تعيش بين الخلايا. يتم فيها نقل قطرة صغيرة من الدم المأخوذ مباشرة من الحيوان على شريحة نظيفة حيث يتم وضع غطاء شريحة بسرعة والضغط عليه برفق وذلك لفرد النقطة الدموية بحيث لا تراكم الخلايا ولا يفيض الدم خارج محيط غطاء الشريحة. تفحص العينة مباشرة تحت المجهر بعدسة قوة (40x) حيث يمكن ملاحظه الطفيل و يمكن تأكد وجوده بزيادة قوة التكبير. تفضل هذه الطريقة فى الفحص المبدئى لتشخيص المثقبيات المختلفة واليرقات الموجودة بين الخلايا .

2- تشخيص الطفيليات في الشرائح الدموية المثبتة

2-أ- الشريحة الدموية الرقيقة المصبوغة (Stained thin blood film)

يتم تحضير مسحة رقيقة من وخز الإصبع ويمكن استخدام الدم الوريدي المخثر ، بشرط عمل شريحة الدم في غضون 30 دقيقة.

• ينتشر قطرة صغيرة (10-15 ميكرو لتر) على شريحة نظيفة ،تنتشر لتعطي مسحة منتظمة. ثم يتم ملاستها بشريحة اخرى في وضع مائل (زاويه حوالى 30 ° -45 °) وتسحب إلى الامام وحتى نهاية فرد كل العينة.

• المسحة هنا تظهر بشكل واضح لكريات الدم الحمراء والطفيلي .عيبه الوحيد هو أنه لا يمكن مسح سوى كمية صغيرة من الدم ، بحيث يمكن تفويت الاصابة الخفيفة.

• إذا تم تحضير اللطاخة من دم متخثر ، والذي مضى عليه أكثر من ساعة ، فقد لا يكون شكل الطفيليات و RBCs المصابة نموذجيًا امثاليا.

• بعد التجفيف ، يتم تصبغ المسحة بصبغة جيمسا Giemsa أو ليشمان Leishman stain.

❖ بالنسبة لطبغة الجيمسا Giemsa stain

• توجد هذه الصبغة بشكل مركز وبشكل محلول قبل الاستخدام يجب اختبار الصبغة للحصول على الوقت الامثل للتصبغ قبل استخدامها على عينات المرضى.

• يتم تثبيت المسحة في الميثانول لمدة 3-5 دقائق اولاً.

❁ بعد التجفيف، يتم تطبيق صبغة جيمسا ، مخففة قطرة واحدة في لتر من الماء المتعادل buffered water ، الرقم الهيدروجيني 7.2-7 ، لمدة 30-45 دقيقة.

❖ بعدها تغسل الشريحة slide بماء الصنبور (ماء الحنفية) أي يجب ان يكون تدفق الماء ببطي

❖ بعدها تجفف الشريحة slide هنا التجفيف بالهواء للحفاظ على نظافة الشريحة

❖ بعدها تفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية

❖ تحت المجهر سيظهر إن السيتوبلازم لطفيليات الملاريا أزرق اللون ونقطة الكروماتين ملطخة باللون الأحمر هكذا تصبغ صبغة جيمزا العينة

❖ تعد من الصبغات الأكثر شيوعا واستخداما في المختبرات.

• صبغة ليشمان Lieshman Stain (بدون تثبيت): تغطي المسحة بصبغة ليشمان ثم يترك 5 دقائق ثم يغطي بماء مقطر (ضع كمية الصبغة) لمدة 10 دقائق أخرى .
أغسل المسحة بماء مقطر لإزالة الصبغة الزائدة .أتركه يجف وأقرأ المسحة على الميكروسكوب بالعدسة الزيتية .ضع نقطة زيت ميكروسكوب على الطرف الرقيق من المسحة وأفحص بالعدة الزيتية بإضاءة عالية.

ب- الشريحة الدموية السميكة المصبوغة (Stained Thick smear blood)

مزايا الطريقة :- تتميز اللطخات(المسحات) السميكة بأنه يمكن فحص كمية أكبر من الدم. زيادة حجم الدم الموجود على thick film قد يسمح باكتشاف طفيل الملاريا حتى مع انخفاض الطفيليات في الدم. مقارنة بالفيلم الرقيق ، فإن الطبقة السميكة أكثر حساسية بنحو 30 مرة ويمكنها اكتشاف حوالي 20 طفيلي / ميكرو لتر من الدم.

عيوب الطريقة :- العيوب هي أن الخلايا الحمراء تكون مشوهة وشكل الطفيليات مشوهة ، بحيث يصبح تحديد الأنواع صعبًا.

يتم تجميع قطرة أو دم كبير (20-30 µL) من وخز الإصبع أو الكعب على شريحة نظيفة وتنتشر مع زاوية شريحة نظيفة أخرى لتشكيل لطاخة سميكة بشكل موحد وباستخدام حركة دائرية حوالي 1 سم²، سمك نشر الشريحة يجب ان يسمح ان نرى مكونات العينة خلالها استمر في التقليب لمدة 30 ثانية لمنع تكوين خيوط الفيبرين التي قد تحجب الطفيليات بعد التلوين. . يتم تجفيف المسحة (العينة) في وضع أفقي ، ويتم تغطيتها من الغبار

• يجب أن تكون المسحات السميكة منزوع الهيموغلوبين (dehemoglobinized) قبل التصبغ .

• يمكن استخدام صبغة Giemsa or L eishman's stains كما هو موضح سابقًا
صبغة Wright's stain وJSB stain مفيدة جدًا في تلوين أعداد كبيرة من thick films كما هو الحال في مسوحات الملاريا

Wright's stain تتكون الصبغة من محلولين :

تتوفر صبغة رايت تجاريًا في شكل سائل ، وجاهزة للاستخدام ، وأيضًا كمسحوق يجب إذابته في كحول الميثيل اللامائي الخالي من الأسيتون قبل الاستخدام

1. المحلول الاول A يتكون من المثلين الزرقاء methylene blue و azure B في phosphate buffer

2. يحتوي المحلول B على eosin في محلول الفوسفات

• يتم غمر الفيلم في المحلول A لمدة 5 ثوانٍ ، وغسله في ماء الصنبور ، وغمره في المحلول B لمدة 5 ثوانٍ ، وغسله وتجفيفه وفحصه.

• قد تحتاج أوقات التصبغ إلى تعديل. إذا كانت الصبغة زرقاء جدًا ، فبقيت لفترة أطول في المحلول B ؛ إذا كان ورديًا جدًا ، في المحلول A.

الصبغة ايضا تتكون من محلولين Jaswant Singh and Bhattacharjee stain(JSB)

A. يحتوي الأول (1) على ثيلين أزرق ، وثاني كرومات البوتاسيوم ، وحامض الكبريت ، وهيدروكسيد البوتاسيوم والماء.

B. المحلول الثاني(2) هو ابوسين مائي.

التصبغ ، يتم غمر المسحة في المحلول (1) لمدة 10 ثوانٍ ، وغسله لمدة ثانيتين في درجة الحموضة في الماء الحمضي 6.2 - pH6.6 ، مصبوغ في المحلول 2 لمدة ثانية واحدة ، وغسله في الماء الحمضي ، وغمره مرة أخرى في المحلول | وغسله.

فحص سوائل البول أو الجسم URINE OR BODY FLUIDS EXAMINATION

- يجب السماح بكمية كبيرة من عينات البول لتستقر لمدة ساعة إلى ساعتين.
- تؤخذ حوالي 50 مل من الرواسب السفلية للعيينة من أجل الطرد المركزي.
- يتم فحص الرواسب عالية التركيز بعد الطرد المركزي من أجل الفحص المجهرى المباشر.

قد تظهر بيض البلهارسيا Schistosoma في حالة (Schistosoma hematobium) ذات الشوكة الطرفية يمكن أن نرى البويضات في راسب البول، ويكون البول (به دم) في أغلب الأحوال. والتريكوموناس المهبلي Trichomonas vaginalis . يمكن الكشف عن الميكروفلاريا من البول chylous في داء الفيلاريات اللمفي lymphatic filariasis.

فحص الأنسجة TISSUE BIOPSY

يتم أخذ خزعات الأنسجة ورشفة من خلال الإبر الدقيقة من القرحة الجلدية لداء المثقبيات trypan osomiasis أو داء الليشمانيات leishmaniasis ومن العقيدات الجلدية لداء كلابية الذنب onchocerciasis وداء الليشمانيات الجلدي بعد الكالازار post-kala-azar (PKDL).

ناخذ للشمانيا مثالا لهذا الفحص يجب أن يتم سحب المواد التي تحتوي على كائنات الليشمانيا داخل الخلايا من أسفل طبقة القرحة من خلال الجلد غير المصاب ، وليس من سطح القرحة. من المهم جدًا تنظيف سطح القرحة تمامًا قبل أخذ العينات ؛ أي تلوث للمادة بالبكتيريا أو الفطريات قد يمنع استعادة الكائنات الحية من المزرعة.

1. يحدث باخذ الخزعة بواسطة الابرة الرقيقة النظيفة من القرحة الجلدية للشمانيا
2. توضع غلى شريحة زجاجية
3. تثبت بواسطة الميثانول 3دقيقة
4. تترك بعد ذلك تحف
5. تصبغ بصبغة كمزا 20 دقيقة
6. بعد شطف العينة بالماء الجاري يبطئ من الصبغة
7. تترك لتجف تم تفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية (x100)
8. نرى تلون الاجسام (Amastigotes (L.D bodies باللون الوردي

فحص البلغم SPUTUM EXAMINATION

على الرغم من أنها ليست واحدة من أكثر العينات شيوعًا ، فقد يتم تقديم البلغم المنتفخ لفحص الطفيليات. تشتمل الكائنات الحية في البلغم التي قد يتم اكتشافها والتي قد تسبب الالتهاب الرئوي أو الالتهاب الرئوي أو متلازمة لويفلر (Loeffler's syndrome) على مراحل اليرقات المهاجرة من *Strongyloides* و *Ascaris lumbricoides* بيض *stercoralis* والدودة الشصية ؛ *Paragonimus spp.* ، *Echinococcus* ، *P. jiroveci* (المصنفة الآن مع الفطريات) ، *granulosus hooklets* ، *Trichomonas* ، *Entamoeba gingivalis* ، *Entamoeba histolytica* ، *tenax* ، *Cryptosporidium spp.* ، وربما *microsporidia*. في الإصابة ب *Paragonimus a* ، قد يكون البلغم لزجًا ومصبوغًا ببقع بنية اللون ، وهي عبارة عن مجموعات من البيض ("iron filings") ، وقد تكون مخلوطة بالدم.

• عادة ما يتم فحص البلغم على أنه عينة رطبة (مالح أو يود) ، باستخدام طاقة منخفضة وعالية (x10 و x40 و x100).

- العينة تفحص مباشرة من دون اي عملية ترسيب لها .
- إذا كان البلغم سميكًا ، فيمكن إضافة كمية مساوية من 3٪ من هيدروكسيد الصوديوم (أو undiluted chlorine bleach) ؛ يتم خلط العينة بدقة ثم مزجها بالطرد المركزي. لا ينبغي استخدام NaOH إذا كانت العينة *Entamoeba spp*. أو يتم البحث عن *T. tenax*.
- بعد الطرد المركزي ، يتم التخلص من السائل الطافي ويمكن فحص الرواسب كمركب رطب مع محلول ملحي أو اليود.
- إذا كان لا بد من تأجيل الفحص لأي سبب ، فيجب تثبيت البلغم في 5 أو 10٪ فورمالين للحفاظ على بيض الديدان أو اليرقات أو في كحول البولي فينيل المثبت لئتم تصبيغة لاحقًا من أجل البروتوزوا.
- يتم استخدام الصبغات مثل الفضة ميثينامين ، جيمسا ، أو كواشف المقايضة المناعية. في حالة الاشتباه في وجود الكريبتوسبورديوم *Cryptosporidium* (نادرًا) ، يمكن استخدام تقنيات المقايضة الحمضية أو المناعية المستخدمة عادة لعينات البراز.
- قد تساعد صبغة ثلاثي الألوان (Trichrome stains) للمادة في التفريق بين *E. histolytica* من *E. gingivalis* ، وقد تحدد صبغة *Giemsa* بشكل أفضل اليرقات والديدان الصغيرة.

إجراءات فحص البلغم

1. ارتداء القفازات عند تنفيذ هذه الإجراءات.
2. بالنسبة للبلغم المنتفخ (بدون إضافة عامل حال للبلغم):
 - أ. باستخدام ماصة باستور ، ضع 1 أو قطرتين (50 ميكرو لتر) على جانب واحد من شريحة زجاجية ، وغطاء شريحة .
 - ب. ضع القطرة ثانية على الشريحة ، أضف قطرة واحدة من المحلول الملحي ، وغطها بغطاء الشريحة .
3. البلغم المنتفخ (المعالج بعامل حال للبلغم) يمكن إعادة تعليقه في 100 ميكرو لتر من المحلول الملحي ؛ ضع قطرة على شريحة الزجاجية ثم تغطي بغطاء للشريحة .
- 4- حفظ العينة غير المعالجة والعينات المعالجة المتبقية لتحضير اللطاخة الدائمة إذا كانت البقع مطلوبة.
5. قم بفحص التحضير الرطب بالكامل تحت الإضاءة المنخفضة للعدسة ($\times 10$) للكشف عن البيض أو اليرقات أو البويضات أو *trophozoites* الأميبية.
6. إذا كانت النتائج غير حاسمة ، فقم بإعداد المسحات للتصبيغ الدائم.

أ. ضع قطرة واحدة من الرواسب في وسط كل واحد من ثلاثة 1 × 3. شريحة الزجاجية ، وينشر المواد بطرف الماصة.

ب. ضع شريحة واحدة في مثبتات شاولدين (Schaudinn's fixative) أثناء البلل ؛تجفيف الاثنان الآخران جيدا. C. Trichrome

ج. صبغة الشريحة المثبتة في تثبيت Schaudinn.

د- تثبيت المسحات المجففة بالهواء في الميثانول ؛تصبغ واحدة مع جيمسا والأخرى بصبغة معدلة سريعة الحمض. (Modified acid-fast stain). قد يكون من الضروري استخدام صبغة الترايكروم المعدلة (modified trichrome) في حالة الاشتباه في الإصابة بمرض الشحميات الدقيقة microsporidia .

د.ناخذ الشريحة المصبوغة ونضع عليها الزيت (immersion oil) نفحص الشريحة المصبوغة بالكمزا بقوة العدسة (x10). والعينة المصبوغة ب trichrome بقوة العدسة (x50) اذا متوفر خلاف ذلك ، استخدم (100x oil objective).يجب التأكد جيدا ومشاهدة مايقل 300 حقل قبل اعطاء نتيجة سالبة .

هـ. يمكن استخدام صبغة الميثينامين الفضية

ن. بلغ عن أي كائنات وجدت على النحو التالي.

أ- أعط الجنس والأنواع ، إذا لزم الأمر ، بعد التأكيد من وجودة بالتصبيغ الدائم .

ب- "لم يتم العثور على طفيليات" في البلغم المنتظر يعتبر تقريراً طبيعياً / سلبياً .

المصادر

1-Clinical Laboratory Standards Institute. (2005). Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from the Intestinal Tract. Approved guideline M28-2A. Clinical Laboratory Standards Institute، Villanova، Pa.

2 -Garcia، L. S. (1999). Practical Guide to Diagnostic Medical Parasitology. ASM Press، Washington، D.C.

3 -Committee on Education، American Society of Parasitologists. (1977). Procedure suggested for use in examination of clinical specimens for parasitic infection. J. Parasitol. 63:959-960.

4 -Garcia، L. S.، T. C. Brewer، and D. A. Bruckner. (1979). A comparison of the formalin-ether concentration and trichrome-

stained smear methods for the recovery and identification of intestinal protozoa. *Am. J. Med. Technol.* 45:932–935.

5 -Morris, A. J., M. L. Wilson, and L. B. Reller. (1992). Application of rejection criteria for stool ovum and parasite examinations. *J. Clin. Microbiol.* 30:3213–3216.

6 -Public Health Service. (1980). PHS interstate quarantine regulations. 42 CFR part 72, table 43.1. Interstate shipment of etiologic agents. *Fed. Regist.* 45:28–29.

7 - McVicar, J. W., and J. Suen. (1994). Packaging and shipping biological materials, p. 239–246. In D. O. Fleming, J. H. Richardson, J. J. Tulis, and D. Vesley (ed.), *Laboratory Safety: Principles and Practices*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.

8 -Rosenblatt, J. E., L. M. Sloan, and S. K. Schneider. (1993). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in stool specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 16:337–341.

9 -California State Department of Public Health Microbial Disease Laboratory. (1979). PARA-1A Revised. California State Department of Public Health, Sacramento.

10- Faust, E. C., J. S. D'Antoni, V. Odom, M. F. Miller, C. Peres, W. Sawitz, L. F. Thomen, J. Tobie, and J. H. Walker. (1938). A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *Am. J. Trop. Med.* 18:169–183.

11 - Kellogg, J. A., and C. J. Elder. (1999). Justification for use of a single trichrome stain as the sole means for routine detection of intestinal parasites in concentrated stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 37:835–837

12 -Kohn, J. (1960). A one stage permanent staining method for fecal protozoa. *Dapim Refuiim Med. Q. Isr.* 19:160–161.

13 -Lawson, L. L., J. W. Bailey, N. J. Beeching, R. G. Gurgel, and L. E. Cuevas. (2004). The stool examination reports

amoeba cysts: should you treat in the face of over diagnosis and lack of specificity of light microscopy? Trop. Doct. 34:28–30.

14 - Miller, J. M. (1991). Quality control of media, reagents, and stains, p. 1203–1225. In A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

15 -Kehl, K. S. C., H. Cicirello, and P. L. Havens. (1995). Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. J. Clin. Microbiol. 33:416– 418

16 -Fedorko, D. P., E. C. Williams, N. A. Nelson, T. D. Mazyck, K. L. Hanson, and C. P. Cartwright. (2000). Performance of Para-Pak Ultra ECOFIX compared with Para-Pak Ultra formalin/mercuric chloride-based polyvinyl alcohol for concentration and permanent stained smears of stool parasites. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 37:37–39.

17 -Garcia, L. S., and R. Y. Shimizu. (1998). Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in EcoFix: comparison of Wheatley's trichrome stain and EcoStain. J. Clin. Microbiol. 36:1974–1976.

18 -Garcia, L. S., R. Y. Shimizu, A. C. Shum, and D. A. Bruckner. (1993). Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinyl alcohol preservative: comparison of zinc sulfate- and mercuric chloride-based compounds for use in Schaudinn's fixative. J. Clin. Microbiol. 31: 307–310.

19 -Higgins, G. V. (1988). Iodine-trichrome staining technique: a replacement of iodine solution in fecal examination. Lab. Med. 19:824–825.

20 -Shoaib, S., A. Hafiz, and S. Tauheed. (2002). Role of trichrome staining techniques in the diagnosis of intestinal parasitic infections. J. Pak. Med. Assoc. 52:152–154.

- 21-Ignatius, R., M. Lehmann, K. Miksits, T. Regnath, M. Arvand, E. Engelmann, U. Futh, H. Hahn, and J. Wagner. (1997). A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35:446–449.
- 22 -Kellogg, J. A., and C. J. Elder. (1999). Justification for use of a single trichrome stain as the sole means for routine detection of intestinal parasites in concentrated stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 37:835–837.
- 23 - Nair, C. (1953). Rapid staining of intestinal amoebae on wet mounts. *Nature (London)* 172:1051.
- 24- Clinical Laboratory Standards Institute. (2000). Laboratory Diagnosis of Blood-Borne Parasitic Diseases. Approved guideline M15-A. Clinical Laboratory Standards Institute, Villanova, Pa.
- 25- Isenberg, H. D. (ed.). (2004). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed., vol. 1, 2, and 3. ASM Press, Washington, D.C.
- 26 -Isenberg, H. D. (ed.). (2004). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed., vol. 1, 2, and 3. ASM Press, Washington, D.C.
- 27 -Isenberg, H. D. (ed.). (1995). *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 28 - Field, J. W., A. A. Sandosham, and Y. L. Fong. (1963). *the Microscopical Diagnosis of Human Malaria*. 1. A Morphological Study of the Erythrocytic Parasites in Thick Blood Films. Institute for Medical Research, Kuala Lumpur, Malaya.
- 29 -Shute, P. G. (1966). The staining of malaria parasites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60:412–416.
- 30 -Al-Tamemy, Abdul Kareem Aakool, and Noor Naeem Shakir Al-Qurashi. "Identification and Sequences of Two

Leishmania Species Isolated From Human Cutaneous Lesion in Iraq." Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPB) 12 (2017): 53-57.

31 -Schwartz, D. A., R. T. Bryan, K. O. Hewanlowe, G. S. Visvesvara, R. Weber, A. Cali, and P. Angritt. (1992). Disseminated microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) and acquired immunodeficiency syndrome—autopsy evidence for respiratory acquisition. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:660–668.

32-Current, W. L., and L. S. Garcia. (1991). Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:325–358.

33- Siddons, C. A., P. A. Chapman, and B. A. Rush. (1992). Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in faeces and environmental samples. *J. Clin. Pathol.* 45:479–482.

34- Weber, R., R. T. Bryan, R. L. Owen, C. M. Wilcox, L. Gorelkin, G. S. Visvesvara, and The Enteric Opportunistic Infections Working Group. (1992). Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.* 326:161–166.

35- Paniker's Textbook of Medical Parasitology 7th Edition. by M.D. Paniker, C. K. Jayaram (Author), M.D. Ghosh, Sougata (Editor) 4.5 out of 5 stars 24 ratings. ISBN-13: 978-9350905340.

36- Lynne Shore Garcia -- Diagnostic medical parasitology covers all aspects of ... S. Garcia, M.S., MT, CLS, F(AAM), LSG & Associates, Santa Monica, California.

السيرة الذاتية والعلمية



م.م نور نعيم شاكر محمود

ماجستير

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة واسط ،
واسط ، العراق

المعلومات الشخصية

• الاسم	نور نعيم شاكر محمود
• المواليد	1991/05/18
• مكان الولادة	الكويت ، العراق
• الجنس	انثى
• الجنسية	عراقية
• الحالة الزوجية	/
• عدد الأطفال	/
• رقم الهاتف الجوال	07805449702

المعلومات الأكاديمية

• اللقب العلمي	مدرس مساعد
• القسم العلمي	قسم علوم الحياة، كلية العلوم ، جامعة واسط
• التخصص العام	علم الحيوان
• التخصص الدقيق	علم الطفيليات
• البريد الإلكتروني	noornaem1991@gmail.com gl1108@uowasit.edu.iq

التحصيل الدراسي

الشهادة	السنة	التخصص	الجهة المانحة
• ماجستير	2018	علم حيوان	كلية العلوم – جامعة واسط - العراق
• بكالوريوس	2013	علوم حياه	كلية العلوم – جامعة واسط - العراق

الألقاب العلمية

• مدرس مساعد	2018 / 10 / 1
--------------	---------------

الفصل السادس

جمع وحفظ الحشرات

Collecting And Preserving Insects

د. عدنان موسى محمد عثمان

يجب أن يكون الهدف الأساسي من تكوين المجموعات الحشرية هو أولاً " سهولة دراسة الحشرات من الناحية التصنيفية أو النقسيمية " وثانياً " معرفة الحشرات ذات الأهمية الاقتصادية منها التي تشغل اهتمام المزارعين والتي تسبب خسائر فادحة في المحاصيل الزراعية وأشجار الفاكهة وكذلك التي تنقل امراضاً كثيرة للإنسان والحيوان".

ولتكوين مجموعة حشرية يجب الإلمام بالنقاط الآتية:

1. ان يحدد أفضل فصول السنة التي تنتشر فيها الحشرات محل الدراسة حتى يتسنى له البحث عنها وعن أطوارها المختلفة بسهولة ويسر.
2. تحديد العوامل التي تعيش عليها هذه الحشرات حتى يمكنه الحصول عليها وتربيتها وتحديد الطور الذي يسبب الضرر.
3. المعرفة الجيدة لدورات حياة الحشرات وسلوكها وطبائعها وأيضاً معرفة أعدائها الطبيعية إن وجدت.
4. بعد أن يتم المعرفة والعلم بهذه النقاط الثلاثة يجب على المشتغل بهذه المهمة أن يكون مستعداً بالأدوات والتجهيزات اللازمة لجمع وتصبير الحشرات وحفظها.

أ. طرق تجميع وحفظ الحشرات Methods of collecting and preserving Insects

قبل البدء في التعرف على الحشرات ودراستها لغرض تصنيفها أو لدراسة الشكل الخارجي أو التشريح الداخلي، يجب إتباع الخطوات التالية لتجميع وحفظ الحشرات ليسهل دراستها.

أولاً: التجميع Collection

للبدء في عملية تجميع أي نوع من أنواع الحشرات يجب تحديد الآتي:

أ. اختيار الأدوات المناسبة لتجميع الحشرات.

ب. اختيار الطريقة الملائمة لتجميع الحشرات.

أ. الأدوات المستخدمة في تجميع الحشرات (شكل 1-6)

Collecting Insects

1. شبكة حشرات
2. زجاجات لقتل الحشرات
3. الشفاطة لسحب الحشرات الصغيرة الحجم

4. عدسة يد مكبرة
5. سكين أو مطوى
6. ملقط وإبرة ومقص
7. انابيب زجاجية أو من اللدائن سعة (75×52 مم) أو (10×50 مم)
8. مصائد وكراسة ملاحظات وقلم
9. حافظة خاصة لأدوات التجميع.



شكل (1-6) يوضح الأدوات المستخدمة في التجميع

ب. طرق تجميع الحشرات Methods of Collection Insects

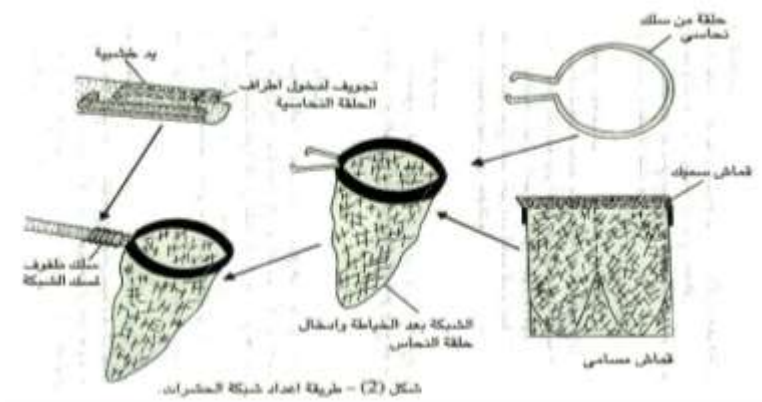
بعد إعداد الأدوات اللازمة لتجميع الحشرات يجب إتباع إحدى طرق التجميع المناسبة الآتية:

1. الالتقاط باليد أو الملاقط Picking by hand or forceps

تستخدم هذه الطريقة في تجميع الحشرات الأرضية كبيرة الحجم كالخنافس والصراصير والنمل حيث يتم التقاطها باليد ووضعها في زجاجة القتل. كما تستخدم هذه الطريقة في جميع الحشرات المختبئة تحت قلف الأشجار، أو على الأوراق والأزهار، أو الحشرات المتطفلة على العائل.

2. التجميع بواسطة الشبكات Collecting by nets

تستخدم شبكات خاصة لتجميع معظم أنواع الحشرات الطائرة والمائية. وتصنع الشبكة من قماش خاص طوله حوالي 65 سم، وقطر الفتحة المعدنية للشبكة 30 سم لتدعيم حلقة الشبكة. ويتصل بالحلقة يد مصنوعة من الخشب أو الألومنيوم أو النحاس المجوف يصل طولها حوالي 40 سم. وتجهز شبكة التجميع كما في (شكل 2-6) ويوجد ثلاثة أنواع مختلفة من شبكات تجميع الحشرات هي:



شكل (2-6) طريقة اعداد شبكة الحشرات

(أ) شبكة الفراشات Butterfly net

شبكة مصنوعة قماش ابيض خفيف من النايلون المسامي الشفاف لكي يسهل رؤية الحشرات داخل الشبكة، وتستعمل هذه الشبكة عادة في تجميع الفراشات والرعاشات.

(ب) شبكة الكنس Sweep net

مصنوعة من قماش سميك نوعا ما، وتستعمل في تجميع معظم أنواع الحشرات الموجودة على المزروعات الحلقية كالقمح والبرسيم والبطاطس والأعشاب والحشائش ويتم تجميع الحشرات بحركة الكنس (امتداد اليد على الجانبين من الجسم) على المحاصيل بالشبكة عدة مرات، ثم تلف الشبكة أو تنثنى بالثواء اليد بسرعة . تنثنى الشبكة بعد ذلك على حلقة السلك المعدني حاذرة الحشرات داخلها ثم تنقل الحشرات المصطادة إلى زجاجة القتل.

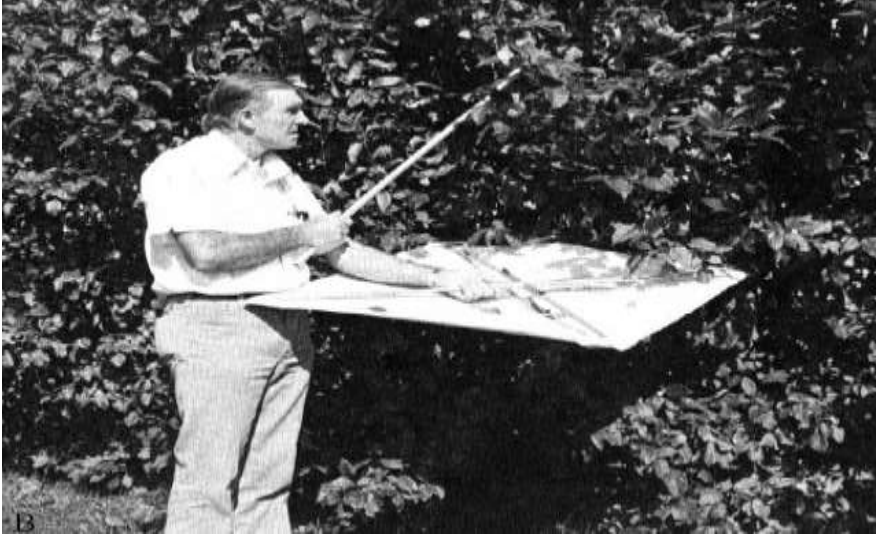
(ج) الشبكات المائية Aquatic net

تستخدم لتجميع الحشرات المائية وتصنع من قماش سميك أو من التيل المسامي. وتتميز شبكة الماء بصغر حجمها وثقلها، وبها يد طويلة لتصل إلى العمق المطلوب. تجر الشبكة على أرضية القاع ومنها بسرعة إلى السطح، يتسرب الماء وتبقى الحشرات في قاع الشبكة ويتم نقلها إلى إناء التجميع.

3. الضرب على النباتات فوق قطعة من القماش Beating on Plants over piece of fabric

تستخدم طريقة الضرب في تجميع الحشرات الموجودة على الأشجار والشجيرات بضرب الأغصان والفروع بعصا فيتساقط ما عليها من حشرات في مختلف أطوار نموها

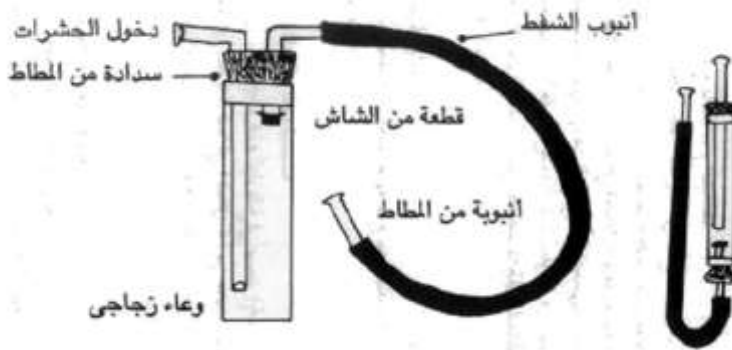
على قطعة قماش مشدودة الجوانب أو إنشاء تجميع مسطح أسفل الأغصان والأفرع. (شكل 3-6).



شكل (3-6) شبكة الضرب على الأشجار

4. التجميع باستخدام الشفافة Assembling using aspirator

تستخدم هذه الطريقة في جمع الحشرات الصغيرة جدا وخاصة المراد جمعها حية مثل المن والنمل وغيرها من الحشرات الغيرة الدقيقة التي يصعب تجميعها باليد.



شكل (4-6) نوعين من الشافطات الزجاجية

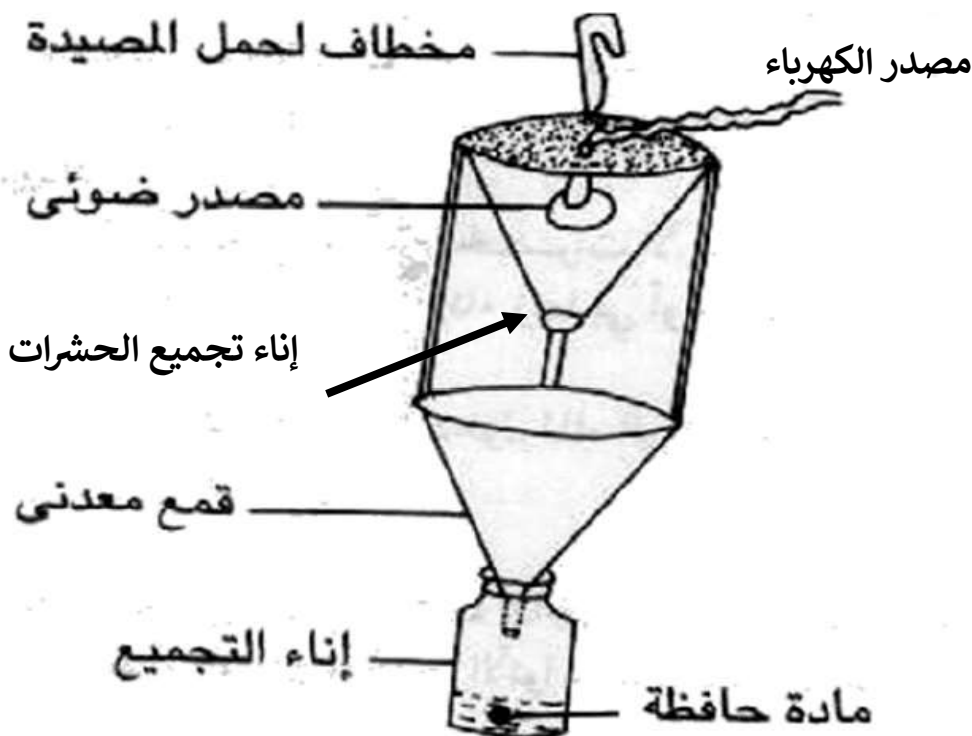
وتتكون الشفاطة كما في (شكل 4-6) من وعاء زجاجي به سداة من المطاط أو الفلين تنفذ منها أنبوتان من الزجاج أو النحاس، وتوضع الأنبوبة القصيرة على الحشرات عن طريق الشفط، ويمنع دخول الحشرات التي جمعت داخل الشفاطة إلى الفم وجود قطعة من الشاش حول فتحة الأنبوبة.

5. المصائد Traps

تستخدم المصائد بجميع أنواعها لتجميع العديد من أنواع الحشرات ومن أهم أنواعها:

(أ) المصائد الضوئية Optic Traps

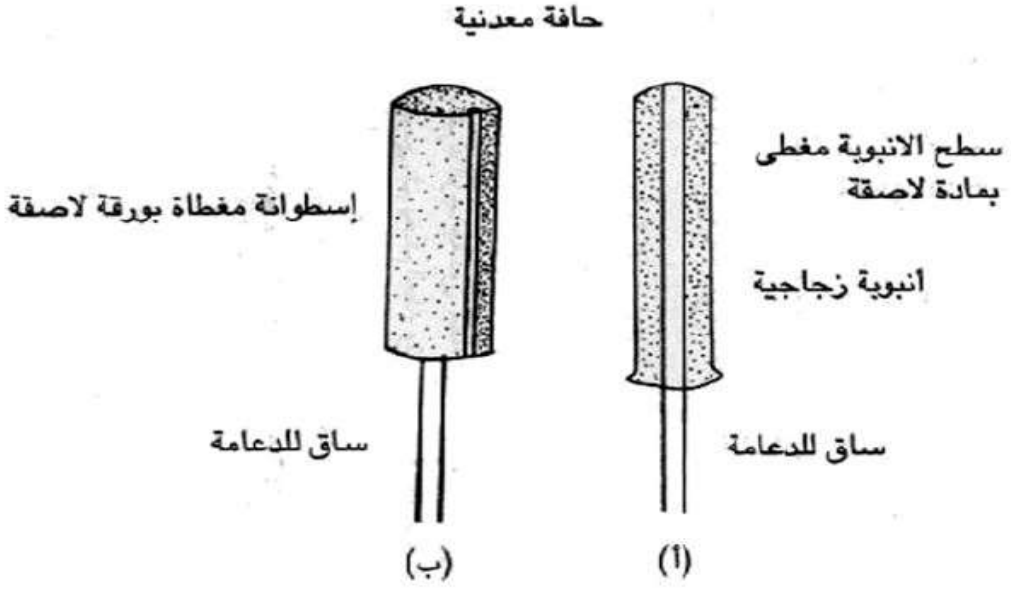
تستخدم هذه الطريقة في صيد الحشرات التي يزداد نشاطها ليلاً وتتركب المصائد الضوئية كما في (شكل 5-6) من مصدر ضوئي (مصباح كهربائي 200 وات) وقمع معدني أملس الجدران، يوجد أسفله مباشرة إناء تجميع يحتوي على مادة حافظة (السيانيد)



شكل (5-6) رسم تخطيطي لمصيدة ضوئية

(ب) المصائد اللاصقة Adhesive Traps

تستخدم هذه الطريقة في جمع الحشرات النشطة ليلاً ونهاراً. وهي عبارة عن أسطوانة أو أنبوبة زجاجية أو لوح من الورق أو البلاستيك مغطاة بمادة لاصقة، وتوضع على دعامة على الارتفاع المطلوب، ويتم دراسة وحصر والتعرف على الحشرات الملتصقة كما في الشكل (6-6) .

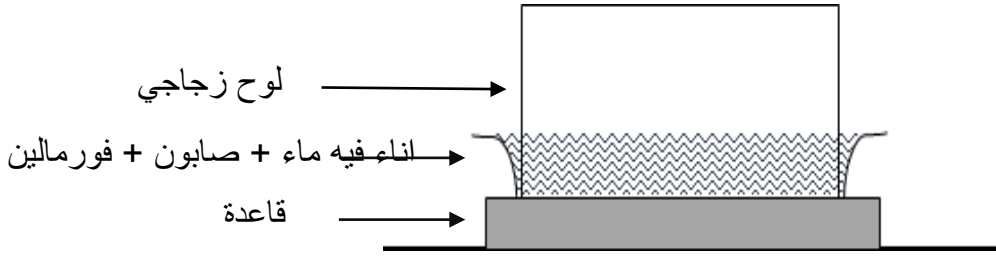


أ - أنبوبة زجاجية ب - المصائد اللاصقة

شكل (6-6) - المصائد اللاصقة

(ج) مصائد الاطباق المائية Water dishes traps

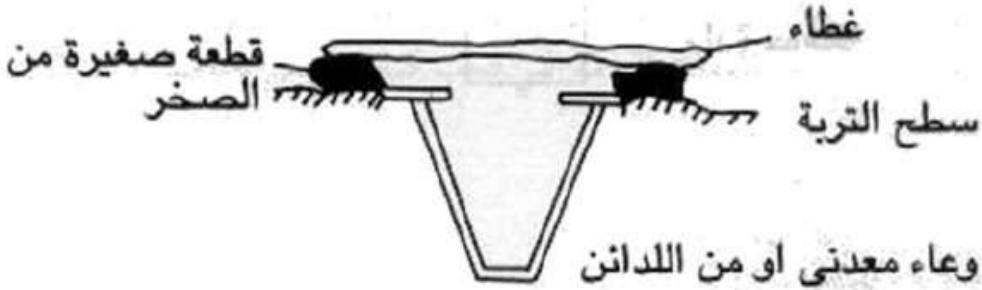
تستخدم هذه الطريقة لجمع أنواع كثيرة من الحشرات مثل المن والذباب، وهي عبارة عن أوان مطلية من الداخل باللون الأصفر أو الأبيض لجذب الحشرات إليها. دائرية أو مستطيلة الشكل من الزجاج أو اللدائن أو المعدن وتعبأ أواني الجمع بالماء المضاف إليه قليل من الصابون فيعمل على نزول الحشرات من السطح إلى قاع الإناء. كما يضاف أيضا 5% من الفورمالين لحفظ الحشرات من التعفن. توضع المصائد على ارتفاعات مختلفة ، وينصح بملاحظتها باستمرار حتى لا يظهر الماء اثناء سقوط الامطار أو يتبخر نتيجة لحرارة الشمس العالية. ولزيادة كفاءة هذه المصائد يوضع بداخل الإناء لوح من الزجاج أو صفيحتان من الألومنيوم في وضع متعامد كما في (الشكل 7-6)



شكل (7-6) مصائد الاطباق المائية

(د) المصائد المستورة او الأرضية Hidden or ground traps

تستخدم هذه الطريقة في تجميع الحشرات الأرضية مثل الخنافس، النمل وصراصير الحقل وتتركب هذه المصائد من إناء زجاجي أو من لدائن ذات فوهة واسعة ويغمر الإناء في حفرة تحت سطح التربة وعند هطول الأمطار يوضع غطاء لمنع دخول الماء إلى المصيدة كما في (الشكل 8-6) .



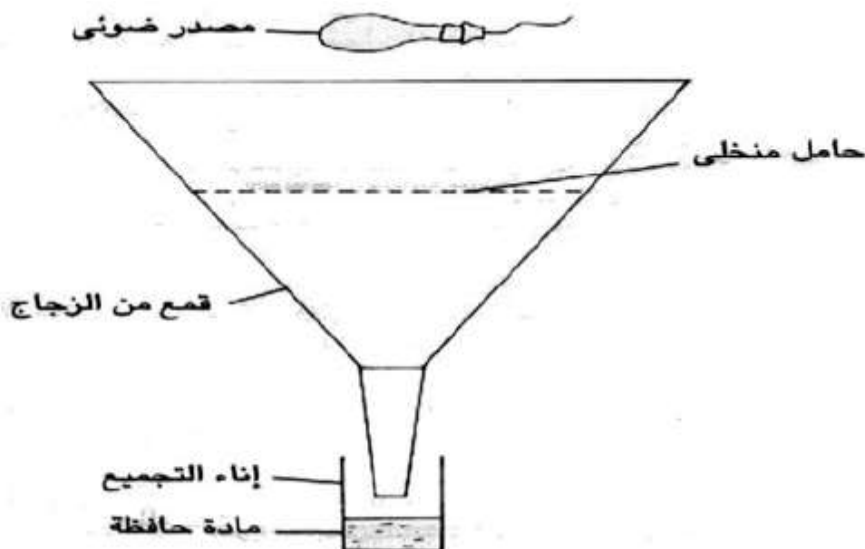
شكل (8-6) – المصائد المستورة

6. الغريلة Screening

يستخدم في هذه الطريقة بعض أنواع من المناخل أو قمع بارليز . والتجميع باستخدام طريقة المناخل يتم بجمع الحشرات الصغيرة التي توجد على بقايا النباتات والأوراق المتساقطة وكذلك الحشرات الموجودة مع المواد الغذائية والحبوب المخزونة. ويتم غريلة هذه المواد المختلطة بوضع كمية منها في المنخل وتغربل ببطء على قطعة من القماش أو الورق المقوى الأبيض وتجمع الحشرات المتساقطة بواسطة الشفاطة أو فرشاة مبللة.

وفي حالة استعمال قمع بارليز (شكل 9-6) توضع العينة المحتوية على الحشرات وبقايا النباتات على حامل منخلي في قمع كبير من الزجاج يوضع اسفله إناء يحتوي على 70 % كحول لتسقط فيه الحشرات، ويعلو القمع مصباح كهربائي

لتسليط الضوء والحرارة على بعد مناسب من العينة تجعل الحشرات تتحرك اسفل القمع وتسقط في إناء التجميع.



شكل (9-6) - قمع

ثانياً : قتل الحشرات Insects killing

الخطوة التي تلي تجميع الحشرات الحية، ويتم فيها وضع الحشرات التي جمعت في زجاجات القتل الخاصة. وهذه الزجاجات ذات احجام مختلفة وفوهة واسعة وغطاء محكم، ويوضع داخلها مادة كيميائية لقتل الحشرات.

ومن أهم المواد الكيميائية المستخدمة في قتل الحشرات سيانور الصوديوم أو البوتاسيوم، الكلوروفورم، رابع كلوريد الكربون، وخلات الإيثايل. وتعتبر مادتي سيانور الصوديوم والبوتاسيوم من المواد السامة جداً.

وتجهز زجاجة قتل الحشرات كالآتي :

1. احضار زجاجة قتل ذات فوهة واسعة نظيفة جافة.
2. توضع طبقة من مسحوق سيانور الصوديوم أو البوتاسيوم في قاع الزجاجة (مادة سامة جداً للكائنات الحية).
3. يغطي السيانور بطبقة من الجبس الجاف، تليها طبقة أخرى من الجبس المبلل.
4. تترك الزجاجة دون غطاء في مكان ملائم حتى يجف الجبس لمدة يوم أو يومين، ثم يحكم الغطاء وتصبح جاهزة للاستعمال بعد مدة تتراوح بين 24 - 48 ساعة .

5. يلف شريط لاصق حول قاع الزجاجاة من الخارج لمنع تبعثر المادة الكيميائية في حالة كسر الزجاجاة، كما تلتصق علامة (خطر) على الزجاجاة من الخارج كما في (شكل 6-10) .

6. أما بالنسبة للمواد الكيميائية الأخرى (الكلوروفورم، رابع كلوريد الكربون، وخلات الإيثايل) فهي أقل سمية من مادة السيانور، وتجهز زجاجاة القتل لهذه المواد بوضع قطعة قطن مبللة بإحدى هذه المواد في قاع الزجاجاة كما يجب إضافة المواد المستعملة كل 24 ساعة في حالة تكرار استخدامها للحفاظ على فعاليتها لمدة طويلة. وتعتبر مادة الإيثايل غير ضارة بالإنسان، أما مادتي الكلوروفورم ورابع كلوريد الكربون فهي من المواد السامة للإنسان وينصح بعد استنشاقها.



سيانور البوتاسيوم (حالياً يستعمل رابع كلوريد الكربون)

شكل (6-10) زجاجاة قتل الحشرات

ثالثاً : حفظ الحشرات Insects keeping

توجد طرق مختلفة لحفظ وتخزين الحشرات لفترة طويلة من الزمن أهمها:

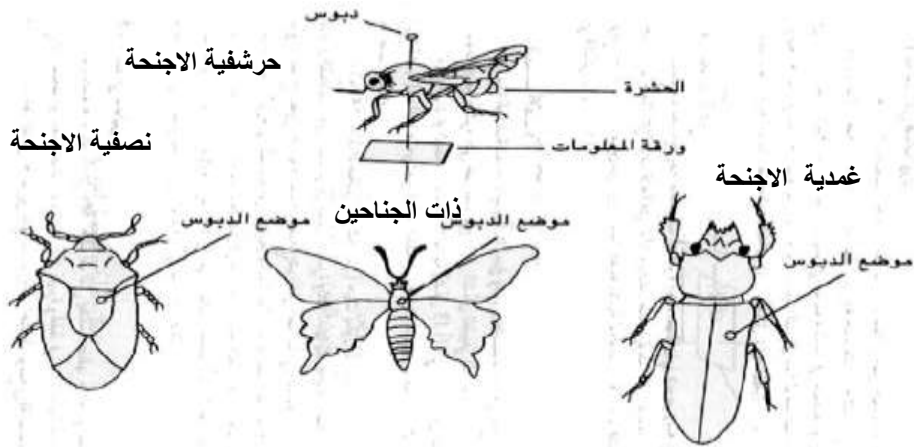
- التدبيس والتجفيف (الحفظ الجاف) Stapling and drying

يفضل استخدام هذه الطريقة لحفظ الحشرات داخل صناديق وإدراج الحشرات. وتستخدم هذه الطريقة عادة للحشرات ذات الجليد الصلب حتى تجف وهي في حالة جيدة. ثم تحفظ العينات في صناديق خاصة مصنوعة من الخشب ذات غطاء زجاجي محكم وقاع فليني. ويكون مقاس الصندوق عاد $64 \times 23 \times 30$ سم. وترتب النماذج الحشرية داخل هذه الصناديق غالباً وفقاً للترتيب التقسيمي للرتب والعائلات.

ولحماية النماذج الحشرية من التلف بواسطة الحشرات الأخرى مثل النمل وخنافس الجلود. توضع في زوايا الصندوق كمية من النفتالين أو الكريوزت أو الباراديكلوروبنزين على هيئة كرات أو على هيئة مسحوق في صرة من الشاش. وتتم عملية التدبيس والتجفيف في المراحل الآتية :-

(أ) التدبيس المباشر Direct Pinning

تستخدم دبائيس غير قابلة للصدأ ذات اقطار مختلفة، وبعد قتل الحشرة مباشرة وقبل جفافها يغرز الدبوس عادة عمودياً في منطقة الصدر، بحيث يترك حوالي 1/4 طول الدبوس أعلى جسم الحشرة. وفي حالة الحشرات من رتبة غمدية الأجنحة يغرز الدبوس اماماً في الغمد الأيمن، أما الحشرات نصفية الأجنحة فيجب أن يمر الدبوس بالصفحة الوسطى المثانة للحلقة الصدرية كما توضع أسفل الدبوس قصاصة أو قصاصتين من الورق لكتابة المعلومات الخاصة كما في (الشكل 6-11) .



شكل (6-11) مواضع مختلفة لتثبيت الدبائيس في الحشرات

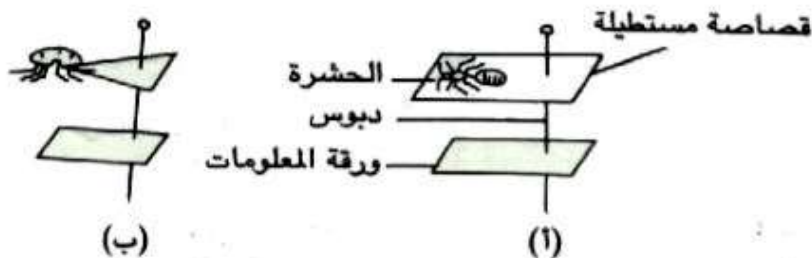
المعلومات الهامة التي يجب كتابتها على قصاصات الورق تشمل الآتي:

اسم الحشرة - تاريخ التجميع - العائل (المحصول) - اسم الجامع - مكان التجميع مع ملاحظة كتابة البيانات المذكورة بالحبر الصيني، الهندي الأسود ، او بقلم الرصاص (لأنها لا تتأثر بالماء) .

(ب) التحميل على قصاصة ورقية Loading on a piece of paper

تجهز الحشرات الصغيرة الحجم كالحشرات المتطفلة وبعض الحشرات غشائية الأجنحة وثنائية الأجنحة ونصفية الأجنحة، بهذه الطريقة حيث تلتصق الحشرة على قصاصة ورق بيضاء بغراء شفاف أولاً ثم يغرز الدبوس في موضع مناسب في قصاصة الورق يقابل موضع الحشرة، وتكون قصاصة الورق مثثة أو مستطيلة الشكل

كما توضع قصاصة ورقية أخرى اسفل العينة لكتابة المعلومات الخاصة بالحشرة. (شكل 12-6).

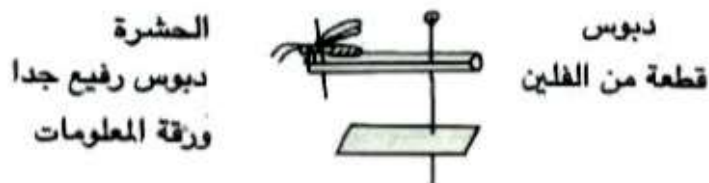


شكل (12-6) - تحميل على قصاصة ورقية

(أ - قصاصة مستطيلة ب - قصاصة مثثة)

(ج) التحميل المزدوج Duplex mounting

تستخدم هذه الطريقة للحشرات الصغيرة جداً، حيث يغرز دبوس رفيع في صدر الحشرة ثم على طرف قطعة من الفلين ويحمل طرفها الآخر على الدبوس العادي. توضع قصاصة أو قصاصتين من الورق اسفل العينة لكتابة المعلومات الخاصة بالحشرة. (شكل 13-6)



شكل (13-6) - التحميل المزدوج

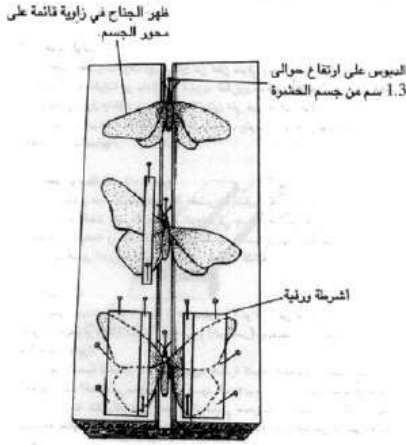
(د) التصليب الفردي : Individual crucifixion

في هذه العملية تفرد الأجنحة والأرجل وقرون الاستشعار في وضع افقي مع مستوى جسم الحشرة حتى تجف هذه الزوائد في الشكل الطبيعي للحشرة. ويتم الفرد أو الصلب باستعمال الصلابة (شكل 14-6 أ) التي تتركب من شريحتين من الخشب إحداهما والأخرى ثابتة على قاعدة خشبية بينهما مجرى يتناسب مع جسم الحشرة.

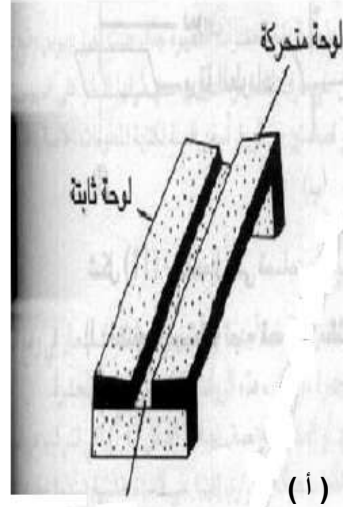
توضع الحشرة المراد صلبها (فراشة مثلاً) حيث يكون كل من الصدر والبطن في مجرى الصلابة، يغرز الدبوس في صدر الحشرة وتثبت نهايته بمجرى الصلابة بحيث يكون السطح العلوي لجسم الحشرة وسطحي شريحتي الصلابة في مستوى

واحد. تفرد الاجنحة على شريحتي الصلابة من الجانبين وتثبت بواسطة شريطين من الورق

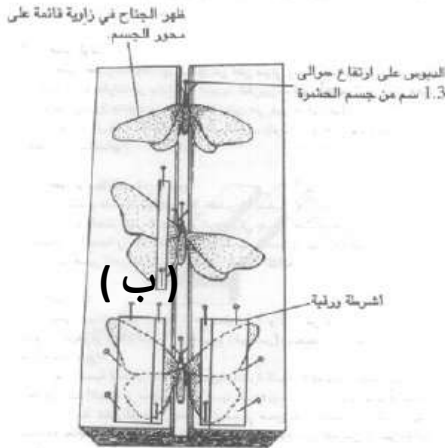
يثبتان بالدبابيس وتوجه زوائد الحشرة الأخرى (الأرجل وقرون الاستشعار) في وضعها الطبيعي كما في (الشكل 6-14 ب) ، وتترك الحشرة على الصلابة لبضعة أيام لتجف بعيدة عن هجمات النمل والحشرات الأخرى، ثم تنقل إلى صندوق الحفظ.



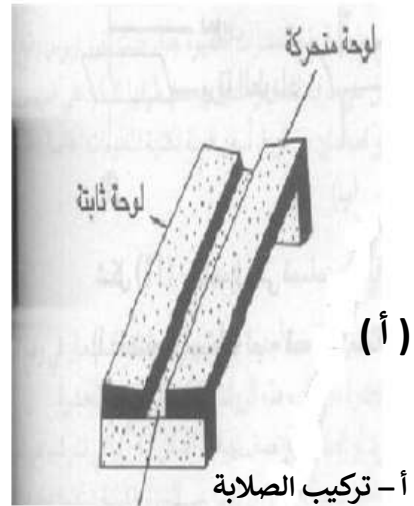
(ب)
ب - طريقة التثبيت



(أ)
أ - تركيب الصلابة



(ب)
ب - طريقة التثبيت
فلين (مجرى الصلابة)

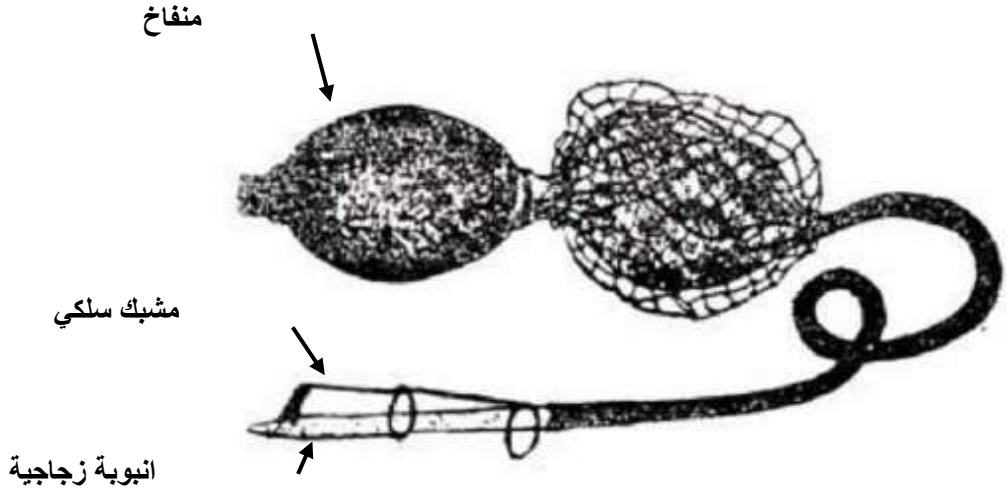


(أ)
أ - تركيب الصلابة
فلين (مجرى الصلابة)

شكل (6-14) - التثبيت الفردي للحشرات

تحنيط اليرقات Larva mummification

اليرقة هي الطور الهام في حياة الحشرة الذي يسبب معظم الأضرار للنباتات والأشجار والخضراوات وغيرها، ويستعمل لتحنيط اليرقة منفاخ خاص وهو عبارة عن منفاخ له يد من المطاط لطرد الهواء إلى كيس من المطاط أيضاً كما هو موضح بالشكل ينفذ منه الهواء خلال أنبوبة من نفس المادة يوصل بها أنبوبة زجاجية تنتهي بطرف مدبب يدخل في الفتحة الشرجية لليرقة عند تحنيطها ويتصل بالأنبوبة الزجاجية مشبك من السلك ليثبت اليرقة في طرف الأنبوبة الزجاجية (شكل 6-15) .



شكل (6-15) منفاخ تحنيط اليرقات

وتتلخص طريقة تحنيط اليرقات كالآتي:

1. تنقل اليرقة أولاً من السيانور ، ثم يوسع فتحة الشرج بطرف دبوس ثم توضع اليرقة على جبهة البطنية فوق قطعة من الورق النشاف وبقلم رصاص أو نحوه يدار جسم اليرقة بالضغط عليه بلطف باليد ابتداء من قرب فتحة الشرج بالتدريج حتى تصل إلى قرب الرأس وبذلك تخرج جميع أحشاء اليرقة الداخلية ويجب ألا يكون الضغط شديداً حتى لا يمزق جلد اليرقة أو تزول بعض الألوان التي تساعد على تمييز اليرقة.

2. بعد اخراج جميع أحشاء اليرقة يؤتى بالمنفاخ الخاص بتحنيط اليرقات ويوضع طرف الأنبوبة الزجاجية المدبب في فتحة الشرج لليرقة ويثبت بالسلك ثم يضغط على المنفاخ قليلاً حتى يملأ الهواء جسم اليرقة المفرغ حتى يصبح شكلها ممثالاً لحالتها الطبيعية قبل اخراج الأحشاء ثم تعرض للهواء الساخن المنبعث من حمام رمل ليجف جلدها ويجب خلال مدة التجفيف إبقاء جسم اليرقة مشدوداً بالنفخ

المستمر كما يجب عدم تعرض اليرقة للهواء الساخن مدة أطول مما يلزم للتجفيف حتى لا تحترق أو يتغير لونها .

الحمام الرملي Sand Path

الحمام الرملي الذي ينبعث منه الهواء الساخن ليجفف اليرقات وهو عبارة عن علبة من الصفيح مستطيلة أو مربعة الشكل في إحدى جانبيها فتحة مربعة وفي وسطها السفلي فتحة أخرى ممائلة تغطي بطبقة من الزجاج لمشاهدة عليها اليرقات أو يمكن الحصول عليها من أجل تربية اليرقات في صناديق التربية حتى تتحول إلى عذارى.

طريقة تجفيف العذارى Methods of drying pupa

ولتجفيف العذارى تنقل أولاً إلى زجاجة السيانور وتترك مدة كافية ليتم قتلها وبعد ذلك إما أن تلتصق بواسطة الصمغ فوق قرص من الورق المقوى أو على الطرف المدبب من الورق المقوى إذا كان حجم العذراء صغيراً أما في حالة العذارى كبيرة الحجم فيغرس في طرفها بعد قتلها مباشرة دبوس مناسب لحجم العذراء.

الحفظ في محاليل Store in Solution

تستخدم هذه الطريقة في حفظ الحشرات التي يصعب حفظها جافة، أو للحشرات التي تم تجميعها بواسطة المصائد الضوئية بأعداد كبيرة وتحفظ في مادة حافظة تتكون من 70 % كحول مع قطرات من الجلوسرين لمنع تصلب زوائد الحشرة. توضع ورقة المعلومات الخاصة بالعينة مكتوبة بقلم الرصاص داخل زجاجة الحفظ وتحكم الزجاجاة بغطاء محكم مع إضافة الكحول من وقت لآخر.

الحفظ المؤقت Temporary storage

تحفظ الحشرات مؤقتاً بين طبقتين من قطن صوفي وتلف أغلفة من الورق مع كمية من النفطالين أو قطرات من مادة رابع كلوريد الكربون، وتجهز أغلفة الورق بأخذ قطعة مستطيلة من الورق وتطوى من زاويتي متقابلتين على هيئة ظرف.

الحفظ بواسطة الشرائح المجهرية Save with microscopic slides

تستخدم هذه الطريقة في حفظ الحشرات الصغيرة جداً كالقمل والبراغيث والمن والتريس. أو لحفظ بعض الأجزاء أو الزوائد في جسم الحشرة مثل الارجل وقرون الاستشعار والاجنحة وأجزاء الفم والثغور التنفسية والقصبات الهوائية وغيرها.

يتم تحضير الشرائح المجهرية باتّباع الخطوات التالية.

(أ) التفكك Disintegration

تغلى العينات (أو أجزاء الحشرة) في محلول 10 % من هيدروكسيد الصوديوم (صودا كاوية) أو هيدروكسيد البوتاسيوم، وتعتمد مدة الغليان على مدى صلابة هذه الأجزاء أما بالنسبة لتحضير شرائح مجهرية لحشرة كاملة رهيبة مثل المن أو التريبس ، تتقع الحشرة في محلول هيدروكسيد الصوديوم أو البوتاسيوم البارد أو الدافئ لمدة 20 دقيقة . تنتقل العينة من المحلول وتوضع في صحن به ماء لغسل وإزالة الشوائب المتفككة بعناية، ثم تنقل العينة مرة أخرى إلى ماء يحتوي على قليل من حامض الخليك الثلجي.

(ب) إزالة الماء Dehydration

تتم عملية إزالة الماء من العينة بنقلها من الماء الحامض ووضعها في تركيزات تصاعدية من الكحول، مع مراعاة تسلسل التركيزات والزمن المحدد لكل تركيز كالآتي :

1. كحول 30 % لمدة 5-10 دقائق
2. كحول 50 % لمدة 8-10 دقائق
3. كحول 70 % لمدة 10 – 15 دقائق
4. كحول 85 % لمدة 15 – 20 دقائق
5. كحول 95 % لمدة 15 – 20 دقائق
6. كحول 100 % لمدة 20 - 30 دقيقة وينصح عند نقل العينة من تركيز كحولي إلى آخر بالضغط بحذر على العينة بواسطة ملقط غير حاد ليتخلل الكحول انسجة العينة وفي حالة التحضير المجهرى للحشرات الدقيقة أو الرهيبة يجب تعريضها لتركيزات الكحول بزمن اقل .

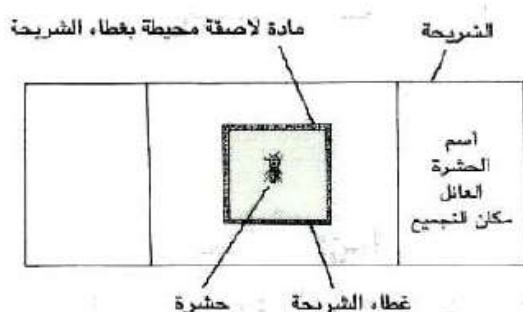
(ج) الترويق Clearing

يستعمل الزيلول في عملية الشفافية كما يستخدم البنزين وزيت القرنفل لنفس الغرض، تجفف العينات كبيرة الحجم من الكحول المطلق بوضعها على ورقة ترشيح ثم تنقل مباشرة إلى الزيلول من 15 – 20 دقيقة لتصبح رائقة أو شفافة بعض الشيء ويجب ألا تبقى العينة لمدة طويلة في محلول الزيلول قبل إعدادها حتى لا تنكسر أجزاؤها.

(د) إعداد العينة على الشريحة Prepare the specimen on slide

بعد عملة الترويق تنظف الشريحة الزجاجية جيداً بالكحول المطلق ويوضع في منتصفها كمية قليلة من صمغ كندا بلسم على العينة وتغطى بغطاء الشريحة الزجاجي بوضعه مائل بمساعدة إبرة لتجنب تكوين فقاعات هوائية في العينة بعد ذلك تلتصق بطرفي الشريحة بطاقة أو بطاقتين وتكتب البيانات اللازمة على بطاقة

بالحبر الهندي كما في (الشكل 6-16) ثم تجفف وتحفظ في علب أو إدراج خاصة بالشرائح.



شكل (6-16) - يوضح طريقة اعداد العينة على الشريحة المجهرية .

المصادر :

- خفاجي ، رضوان محمد توفيق (2010) . أساسيات تصنيف الحشرات، مطبعة الجزيرة - الخرطوم ، ص 360 .
- M.E. Schau ff. (1977). Collecting & Preserving Insects & Mites، Part 1. Canada Department of Agriculture، Minister of Supply on Services Canada PP.69.
- الأستاذ الدكتور أياد يوسف إسماعيل (2018) موسوعة الحشرات .
[https:// archive. Orgldetails](https://archive.Orgldetails)
aeadhajismail gmail 20180227.

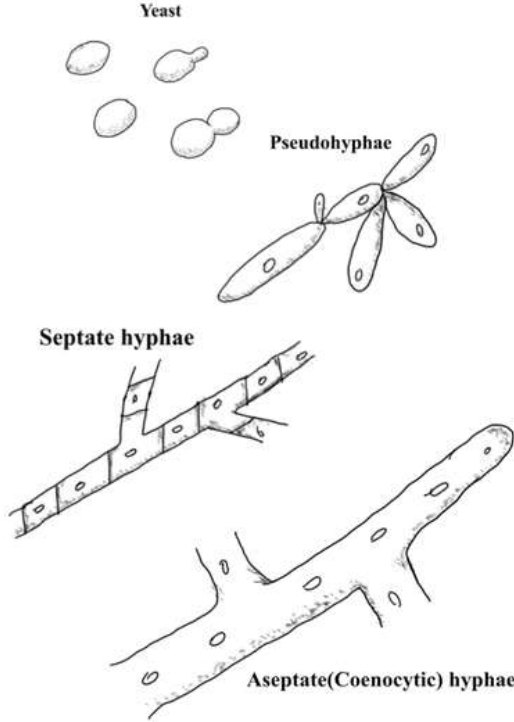
	السيرة الذاتية والعلمية د. عدنان موسى محمد عثمان دكتوراه، استاذ قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق		
المعلومات الشخصية			
• الاسم	د. عدنان موسى محمد عثمان		
• المواليد	1955/07/01		
• مكان الولادة	الموصل، العراق		
• الجنس	ذكر		
• الجنسية	عراقي		
• الحالة الزوجية	متزوج		
• عدد الأطفال	5		
• رقم الهاتف الجوال	07736971500		
المعلومات الأكاديمية			
• اللقب العلمي	استاذ		
• القسم العلمي	قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل		
• التخصص العام	علم الحيوان		
• التخصص الدقيق	علم الحشرات		
• البريد الإلكتروني	dr.adnanmosa@uomosul.edu.iq adnanmosa29@yahoo.com		
• بوابة البحث العلمي	https://www.researchgate.net/profile/adnan_mosa		
• الباحث العلمي	رابط صفحة الـ profile من Google Scholar		
• ORCID	رقم الـ ORCID (يتكون من 16 رقماً: 0000-0000-0000-0000)		
التحصيل الدراسي			
الشهادة	السنة	التخصص	الجهة المانحة
• دكتوراه	2006/9/28	فلسفة حيوان علم الحشرات	كلية التربية – جامعة الموصل - العراق
• ماجستير	1980	بايولوجي الحشرات	كلية الزراعة – جامعة الموصل - العراق
• بكالوريوس	1976	علوم زراعية في وقاية النبات	كلية الزراعة – جامعة الموصل - العراق
الألقاب العلمية			
• مدرس مساعد	1983 / 4 / 12		
• مدرس	1986 / 12 / 4		
• أستاذ مساعد	1990 / 5 / 26		
• أستاذ	2011/11/ 10		

الفصل السابع

عزل وتشخيص الفطريات

أ.د. إنعام محمود نجم الربيعي

تعتبر الفطريات من الكائنات الحية واسعة الانتشار يكاد لا يخلو مكان من تواجدها حيث تتميز كونها حقيقية النواة تكون اما وحيدة الخلية unicellular يطلق عليها بالخمائر yeasts او متعددة الخلايا multicellular يطلق عليها بالاعفان او الفطريات الخيطية molds or filamentous fungi التي تكون بهيئة خيوط فطرية hyphae اما مقسمة بحواجز عرضية ويطلق عليها septate hyphae او غير مقسمة بشكل مدمج خلوي يطلق عليها aseptate hyphae (coenocytic) وتتجمع الخيوط الفطرية مع بعضها وتتداخل لتكون ما يطلق عليه بالـ mycelium (شكل 1-7).

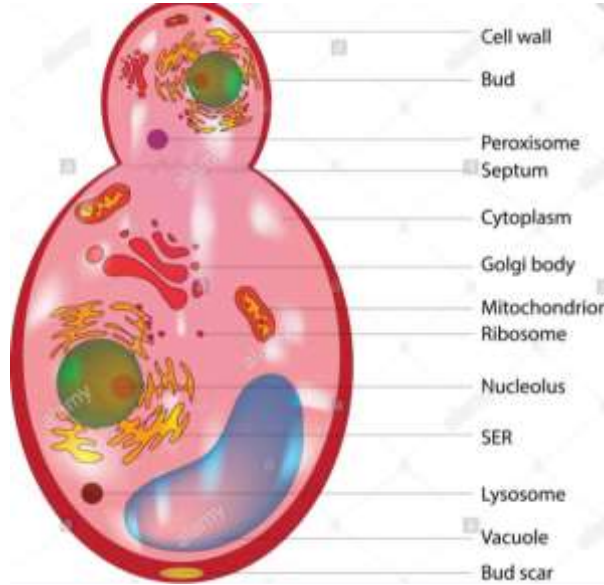


شكل رقم (1-7): اشكال الفطريات المختلفة

تحاط الخلايا الفطرية بجدار خلوي cell wall يتكون بشكل اساسي من الكايتين والكلوكان او السليلوز والكلوكان اضافة الى السكريات البروتينية والانزيمات والمعادن والصبغات ويعتبر الجدار الخلوي من الاجزاء المهمة في الخلية الفطرية حيث يعطيها

الهيئة والشكل ويوفر لها الحماية من البيئة الخارجية ويمتلك صفات مستضدية مهمة في امراضية بعض الفطريات المرضية.

تتميز الفطريات كونها اعتمادية التغذية لانعدام وجود البلاستيدات في خلاياها (شكل 2-7) حيث تعتبر من الكائنات اعتمادية التغذية heterotrophic تعيش غالبا مترمة saprophytes على بقايا المواد العضوية غير الحية (الاجزاء النباتية والحيوانية الميتة) او قد تكون متطفلة على كائنات حية اخرى parasites او قد تنمو بشكل متعايش مع كائنات اخرى مثل النباتات مكونة ما يطلق عليها بالفطريات الجذرية mycorrhizae والاشنات lichens التي تعتبر علاقة تعايشية بين الفطريات والطحالب. حيث تمتلك الفطريات نظام انزيمي متميز وتكون تغذيتها امتصاصية absorption mode اعتمادا على نظامها الانزيمي كونها تفرز انزيمات خارج خلوية extracellular enzymes على المادة الاساس substrate التي تعتبر مصدر غذائها وتقوم هذه الانزيمات بتحليل المواد المعقدة الى بسيطة يسهل امتصاصها من قبل الغشاء البلازمي.

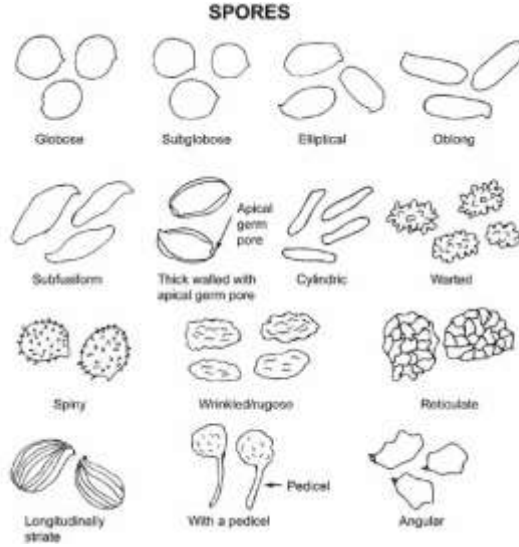


شكل رقم (2-7) : تركيب الخلية الفطرية

تتكاثر الفطريات تكاثرا جنسيا ولا جنسيا وهو الاكثر شيوعا منتجة السبورات الفطرية التي تكون بأشكال وانواع واحجام مختلفة لذلك تعتبر من الصفات المهمة التي يعتمد عليها بتصنيف الفطريات.

يتطلب عزل الفطريات طرق واساليب مختلفة كونها عالمية الانتشار توجد في جميع البيئات المختلفة (القطبية والاستوائية والجبلية والصحراوية والينابيع الحارة وغيرها) فهي توجد في التربة والماء والهواء وعلى الاجزاء النباتية وبعضها يسبب امراض

خطيرة للإنسان والحيوان والنبات نتيجة لانتاجها اعداد كبيرة من السبورات التي غالبا ما تكون صغيرة الحجم يسهل حملها بالهواء او انتشارها خلال الماء وقطرات المطر والحشرات والحيوانات. ولدراسة الفطريات يجب عزلها بمزرعة نقية من البيئة التي جمعت منها العينات حيث يتم من خلال الحصول على المزرعة النقية تحديد شكل ولون وحجم المستعمرات لكل فطر فضلا عن التعرف على التراكيب الخضرية والتكاثرية والاجسام الثمرية التي تكونها بعض انواع الفطريات (شكل 7-3).



شكل رقم (7-3) : الانواع المختلفة للسبورات الفطرية

اما في عزل الفطريات المرضية فيتطلب عزلها اتباع فرضيات كوخ Koch's postulates لاثبات امراضية الفطر وعزله بشكل نقي. ولعزل الفطريات بصورة نقية اهمية لدراسة الفطريات من جوانب تصنيفية وفسلجية ووراثية .

ولتتم عملية عزل الفطريات يجب توفر الاوساط الزرعية المناسبة والظروف البيئية المثلى لكل مجموعة فطرية او لكل فطر حسب حاجة البحث ونوع الفطر من درجة حرارة واس هايدروجيني وتوفر الرطوبة والتهوية والملوحة وحسب نوع الفطر والبيئة المراد عزله منها.

ومن اكثر التحديات التي يواجهها المختصون في حقل علم الفطريات هو التلوث كون الفطريات تمتلك سبورات سهلة الانتشار بسبب صغر حجمها وكثرة اعدادها ، لذلك لا بد من توفر ظروف التعقيم التي تحول وتمنع التلوث اثناء عملية العزل حيث يتوجب تعقيم غرفة العزل وجميع الادوات المستخدمة بعملية العزل من زجاجيات وابر التلقيح والملاقط والمشارط وغيرها اضافة لتعقيم الاوساط المستخدمة لتنمية الفطريات.

وفيما يلي اهم طرق عزل الفطريات:

1. عزل الفطريات من التربة isolation of soil fungi

تلعب فطريات التربة دورا كبيرا في عملية التوازن الاحيائي في من خلال قابليتها في تفسخ وتحليل المواد العضوية كذلك اهميتها للمشتغلين في الامراض النباتية فالكثير من الفطريات تسبب امراضا للنباتات مثل امراض الذبول وموت البادرات والتعفن وغيرها ولذلك لابد من دراستها من حيث عزلها وتقدير كثافتها العددية وتوزيعها .

ومن الطرق الشائعة في عزل الفطريات من التربة

1- الطريقة المباشرة (طريقة الصب المباشر) Direct Plate method

وهي طريقة بسيطة تتطلب وجود اطباق حاوية على اوساط زرعية معينة وحسب طبيعة البحث وكعمل روتيني لشخص مبتدأ يستعمل وسط PCA (potato carrot agar) حيث يتم عمل عدة مكررات لكل عينة تربة وكلما زادت اعداد المكررات حصلنا على معدل ثابت من الفطريات وازداد التنوع .

يتم وزن (1غم) من التربة على اساس الوزن الجاف ثم تنشر بواسطة ملعقة مختبرية على سطح الوسط الزرع في اطباق بتري ثم تحضن بعد ان تعلم بالمعلومات والتاريخ ويكون الحضن على درجة حرارة 25 °م وبعد الحضن تفحص الاطباق للتعرف على الفطريات النامية. بهذه الطريقة يمكن عزل عدد كبير من الفطريات حيث ان اي جزء فيها سوف يكون موجود في التربة وسوف ينمو ويعطي مستعمرة فطرية .

2-طريقة التخفيف Dilution method

تستخدم هذه الطريقة لحساب عدد المستعمرات في وزن معين من التربة وبالتالي يمكن تقدير الكثافة العددية للفطريات المتواجدة في التربة .

تتطلب هذه الطريقة المواد التالية :-

أ- اطباق بتري معقمة وخالية

ب-دوارق مخروطية معقمة

ت-ماصات معقمة

ث-اسطوانات زجاجية معقمة

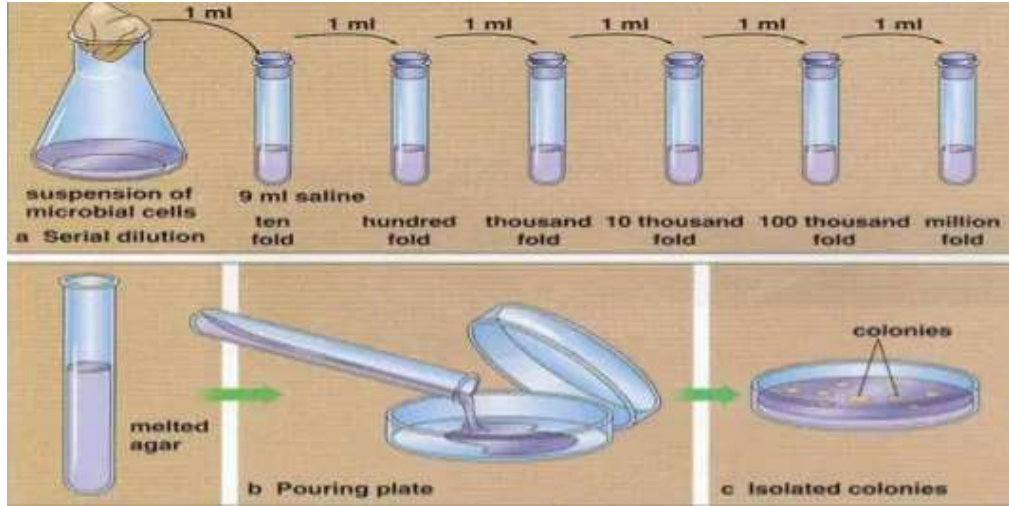
ج-ماء مقطر معقم

ح-وسط زرع جاهز للصب (درجة حرارته 50 °م تقريبا)

تؤخذ عدة مكررات من عينات التربة بصوره عشوائية حسب الغرض من التجربة وتوضع في اكياس بلاستيكية معقمة ثم تجلب الى المختبر وتخلط العينات جيدا ثم تجرى عملية العزل على اساس الوزن الجاف.

يتم عمل سلسلة من التخفيف من عينة التربة بأخذ (10gm) من التربة على اساس الوزن الجاف ويضاف لها (90ml) من الماء المقطر المعقم فيصبح التخفيف (1/10) توضع في دورق مخروطي الشكل ويوضع في الهزاز الكهربائي او يرج باليد حتى

يتجانس المعلق ، ويؤخذ (10ml) من هذا التخفيف بواسطة ماصة معقمة وينقل الى (90ml) ماء مقطر معقم في دورق اخر فيصبح التخفيف (1/100) وتستمر العملية للحصول على سلسلة من التخفيف العشرية (شكل 4-7).



شكل رقم (4-7) : طريقة التخفيف لعزل الفطريات من التربة

يجب تعليم (تأشير) الدوارق جيدا لكي لا تختلط باستخدام قلم ثابت marker . ثم ينقل (1ml) من التخفيف الى طبق بتري معقم وسخالي ويعمل لكل تخفيف عدد من المكررات وكلما ازداد عدد المكررات كلما قلت نسبة الخطأ وامكن الحصول على معدل ثابت لعدد المستعمرات النامية .

✓ غالبا ما تهمل التخفيف الاولى لان عدد المستعمرات سوف يكون كبير جدا فيها وبذلك يصعب عدّها وان هذه العملية تعتمد على طبيعة التربة فاذا كانت التربة غنية بالمواد العضوية مثل الترب الزراعية والترب الحاوية على الاسمدة العضوية فيعمل لها تخفيف كثيرة اما اذا كانت الترب فقيرة بالمواد العضوية كالترب الرملية والملحية فيعمل منها تخفيف اقل لان عدد المستعمرات المتوقع ظهورها قليل اي ان المجتمع الفطري فيها قليل الكثافة .

يصب الوسط الزرعي في الاطباق الحاوية على التخفيف ثم تحرك حركة رحوية (باتجاه وعكس اتجاه عقرب الساعة) حتى يتم توزيع المعلق بشكل متجانس . تترك الاطباق حتى يتصلب الوسط ثم تحضن بعد ان يتم تعليم الاطباق وتوضع الاطباق مقلوبة في الحاضنة على درجة حرارة 25 °م . وتفحص الاطباق بعد مدة معينة حسب طبيعة البحث.

بعد انتهاء فترة الحض التي تتراوح ما بين 5-10 ايام ويتم عدّ المستعمرات ويضرب عددها في مقلوب التخفيف للحصول على عدد المستعمرات في 1غم من التربة .

عدد المستعمرات / 1 غم من التربة = متوسط عدد المستعمرات في المكررات x مقلوب التخفيف

2. عزل الفطريات من الهواء isolation of air born fungi

يكون الهواء محمل بأعداد كبيرة من سبورات الفطريات وتختلف اعدادها وانواعها من مكان الى اخر وكذلك من ارتفاع الى اخر وهذه السبورات قد تعود لفطريات مرضية للإنسان والحيوان او للنبات .

وهناك طرق عديدة لعزل الفطريات من الهواء :-

1- استخدام اجهزه خاصة (مضخة) لسحب الهواء الى حيز معلوم وتقدر اعداد السبورات للفطريات اعتمادا على الحجم المعلوم .

2- استخدام مصائد هوائية للفطريات وهي عبارة عن صناديق ذات فتحات معينة توضع فيها شرائح زجاجية عليها غشاء رقيق من وسط PCA او اي وسط اخر او تغطى بمادة لاصقة وتترك لفترة زمنية معينة ثم تؤخذ الشرائح وتفحص تحت المجهر لتحديد الانواع الفطرية .

3- الطريقة الروتينية :- تؤخذ اطباق بتري حاوية على اوساط زرعية وتعرض الاوساط الى الهواء لمدة زمنية معينة ثم تعلم وتوضع في الحاضنة على 25 درجة م° وبعد فترة الحضان تفحص وتشخص الانواع الفطرية.

3. عزل الفطريات من الماء isolation of aquatic fungi

ان قسم من فطريات الماء هو بالأصل من فطريات التربة والتي انحدرت الى الماء ولكن هذا لا يعني عدم وجود فطريات هي بالأصل تعيش في الماء وتمتلك من التراكيب الخاصة التي مكنتها من المعيشة في هذه البيئة حيث تنتج الفطريات المائية سبورات سابحة متحركة zoospores تمتلك اسواط تساعد على الحركة والانتقال بالماء مثل الفطريات البيضية والفطريات الكثريرية وهناك عدة طرق لعزل هذه الفطريات منها

1. طريقة pour plate method

في هذه الطريقة يضاف 2مل من العينة المائية الى طبق بتري ثم يصب فوقها الوسط الزرعي السائل ويحرك الطبق حركة رحوية ثم يعلم ويحضان على درجة حرارة ملائمة.

2. طريقة الطعم baiting method

تستخدم هذه الطريقة لعزل مجاميع فطرية معينة ومنها مجموعة اعفان الماء water mold التي تكثر في المياه العذبة .

تعزل الفطريات المائية بطريقة الطعم (baiting method) وباستخدام بذور القنب او السمسم، او الذباب الميت بعد غسلها بالماء المقطر وغليها لمدة 20 دقيقة، حيث ترج عينات الماء و يسكب 20-25 ml من كل عينة في طبق بتري معقم بقطر 9 سم ثم يضاف لها 3-5 بذور معقمة او ذباب معقم لتشجيع السبورات السابحة

للفطريات المائية على الانبات والنمو. مع الاخذ بنظر الاعتبار عمل مكررات لكل عينة لتقليل نسبة الخطا)، وتحضن الاطباق بدرجة 20 م وتفحص بعد 48 ساعة بواسطة مجهر ضوئي لمراقبة نمو الخيوط الفطرية ، بعد ذلك يتم نقل البذور التي ظهر عليها النمو بعد غسلها بالماء المقطر المعقم الى اطباق بتري معقمة حاوية على ماء مقطر وطعم جديد من البذور او الذباب المعقم و تترك لمدة 72 ساعة حتى تستطيل الخيوط الفطرية ليتمكن فصلها.

يتم الحصول على المزارع النقية من هذه الأطباق بقطع خيط واحد أو مجموعة خيوط وتوضع في طبق حاوي على ماء مقطر معقم لغسلها ونقلها إلى أطباق حاوية على وسط *mineral salt agar* وتحضن الأطباق في الحاضنة لمدة 48 ساعة للحصول على مستعمرة نقية .

- هناك طريقة لعزل الفطريات من الاغصان والاوراق والشعر ومخلفات الحيوانات وبقايا الثمار وغيرها من المواد العضوية تسمى بطريقة الغرفة الرطبة *moist chamber* وتتخلص هذه الطريقة بوضع المادة المراد العزل منها في طبق معقم حاوي على ورقة ترشيح معقمة ومرطبة بماء مقطر معقم ومن ثم تحضن بالحاضنة او بدرجة حرارة الغرفة حسب طبيعة البحث والفطر المراد عزله ويفحص الطبق بين الأونة والاخرى للتعرف على الفطريات النامية وعزلها .

ملاحظة : يتم اضافة 0.05 غم/ لتر المضاد الحيوي *chloramphenicol* لجميع الاوساط الزراعية المستخدمة لتنمية الفطريات وذلك لغرض منع التلوث البكتيري.

4. عزل الفطريات الممرضة للنبات

تكون الاجزاء الهوائية للنباتات المتمثلة بالاوراق والسيقان والثمار وغير الهوائية المتمثلة بالجذور عرضة للاصابة بالفطريات الممرضة التي تسبب اعراض وعلامات على النبات المصاب وقد ينمو الفطر بشكل مرئي على سطح النبات او بشكل غير مرئي داخل خلايا النبات المصاب. ومن الجدير ذكره ان الفطريات قد تكون علاقة تكافلية مع جذور بعض النباتات الوعائية لتكون ما يعرف بالفطريات الجذرية *mycorrhizae* او قد توجد متعايشة داخل النبات بدون ان تسبب له أي ضرر ويطلق عليها مصطلح *endophytic fungi* او قد تكون متطفلة داخلية *endoparasite* او خارجية *ectoparasite* بشكل اجباري *obligatory parasite* او اختياري التطفل *facultative parasite*.

الفطريات اجبارية التطفل لا يمكن عزلها في المختبر باستخدام الاوساط الزراعية في حين ان الفطريات اختياري التطفل يمكن عزلها من خلال جمع الاجزاء النباتية المصابة من اوراق وسيقان وغيرها وتقسيمها الى اجزاء صغيرة 1-0.5 سم تتكون من جزء مصاب واخر سليم ، حيث يتم غسل الاجزاء النباتية بماء الحنفية ثم بالماء المقطر المعقم وتترك لتجف بوضعها على اوراق ترشيح معقمة و بعد ذلك تعقم بغمرها بمحلول هاييوكلورايت الصوديوم بتركيز 5% لمدة تتراوح من 2-3 دقائق لغرض التعقيم السطحي والتخلص من الفطريات غير الممرضة. تنقل الاجزاء النباتية مباشرة

باستخدام ملقط معقم الى وعاء حاوي ماء مقطر معقم لغسلها والتخلص من بقايا المحلول المعقم ومن ثم وتوضع على ورقة ترشيح معقمة لتجف.

تزرع الاجزاء النباتية المعاملة سابقا على احد الاوساط الزرعية الروتينية وبواقع 4-5 قطع في كل طبق مع الاخذ بنظر الاعتبار استخدام المكررات الزرعية وتحضن الاطباق المزروعة بدرجة حرارة 25 م لفترة زمنية تتراوح بين 14-5 يوم ثم ملاحظة النمو الفطري على الاجزاء النباتية المزروعة. كما يمكن عزل الفطريات من الاجزاء النباتية باستخدام طريقة الغرفة الرطبة التي مر ذكرها سابقا.

5. عزل الفطريات الممرضة للانسان والحيوان

يتم اللجوء لعزل الفطريات من الانسان والحيوان عند ظهور اعراض مرضية تشير لوجود اصابة فطرية ناتجة عن غزو واستعمار بعض الانواع الفطرية التي غالبا ما تكون فطريات انتهازية *opportunistic fungi* تصيب المرضى ضعيفي المناعة او قد تكون فطريات ممرضة حقيقية *true pathogenic fungi* تصيب الاشخاص الاصحاء. ويتم عزل وتشخيص هذه الفطريات حسب موقع ومكان الاصابة اضافة الى نوع الفطر الممرض.

عند عزل الفطريات من مناطق خارجية من الجسم يتم تعقيم المنطقة باستخدام الكحول الايثيلي 70% وتترك المنطقة لتجف ثم يتم جمع العينات السريرية اما عند الاصابة الداخلية فيتم العزل من سوائل الجسم التي تكون معقمة بشكل طبيعي كالدّم واللف والسائل النخاعي والادرار فيتم جمع السوائل بشكل مباشر او تعزل من خلال اخذ خزعة نسيجية من مكان الاصابة وتزل على الاوساط الزرعية المناسبة.

a. عزل الفطريات من الجلد والشعر والاظافر

عادة ما تسبب الفطريات اصابات جلدية في مناطق متفرقة من الجسم مسببة بقع جلدية وقشور جافة تاخذ شكل دائري الى بيضوي منتظم بحواف مرتفعة قليلا فضلا عن اصابة الشعر والاظافر ، حيث يتم جمع القشور الجلدية *skin scraping* على شريحة زجاجية او ورقة مصقولة معقمة باستخدام مشرط غير حاد معقم ومن ثم تنقل للمختبر للفحص والزرع. كما يتم جمع عينات الشعر المصاب باستخدام ملقط معقم مسطح النهايات والاظافر باستخدام قلامة الاظافر تفحص القشور والشعر مجهريا بوضع قطرات من محلول KOH 10% على شريحة زجاجية ويضاف لها القليل من القشور الجلدية او اجزاء من الشعر (الصوف لبعض الحيوانات) وتترك لمدة 20 دقيقة في الحاضنة بدرجة 37° م ، او تمرر على اللهب بسرعة بعدها يوضع غطاء الشريحة وتفحص تحت المجهر لمشاهدة الخيوط او الخلايا الخميرية. في بعض الاحيان يتعذر رؤية الخيوط او الخلايا الخميرية باستخدام محلول KOH 10% لذلك يتم التصبغ باستخدام صبغة بعض الصبغات مثل صبغة الميثيل الازرق وصبغة كمزا (ان ماده KOH تقوم باذابة المواد الكيراتينية مما يسمح بمشاهدة الفطريات عند وجودها

في العينة). ويتم زرع القشور على وسط السابرويد (SGA) ووسط السابرويد مضافا له مادة السايكلوهكسميد +C (SGA)، وذلك بنثرها على سطح الوسط الزرعي ويحضان الوسط بدرجة حرارة 37° م .
الاضافر تعامل بنفس الطريقة مع ملاحظة انها قد تكون اكثر صلابة فتحتاج الى وضعها في طبق بتري على ورقة ترشيح رطبة لمدة 24 ساعة ثم تفحص تحت المجهر وتعامل كالسابق تماما . كما تزرع عينات الاظافر على وسط SGA و SGA +C، وذلك بنثرها على سطح الوسط.

b. القيح Abscess

تنظف المنطقة المصابة بإيثانول 70%، ثم تثقب المنطقة بابرنة نظيفة وجمع القيح بانبوب اختبار نظيف ومعقم فإذا كانت كمية القيح كافية يتم ترسيبها باستخدام طريقة الطرد المركزي ويؤخذ الراسب الحاوي على الخيوط الفطرية ويفحص مجهريا باستخدام 10% KOH ، ويؤخذ قليل من الراسب بواسطة مسحة معقمة swab ويزرع على وسط SGA او SGA +C ويحضان بدرجة 30° ماما اذا كانت كمية القيح قليلة فيؤخذ منه باستخدام المسحة معقمة وتفرش على شريحة زجاجية ويضاف له 10% KOH او يترك المسحة لتجف على الشريحة ثم تصبغ باحدى الصبغات المعروفة مثل صبغة كرام او صبغة حامض البريودك.

c. القشع sputum

يتم جمع القشع باستخدام طبق معقم ، يؤخذ النموذج في الصباح قبل الافطار ويجب عدم اعطاء اللعاب saliva او افرازات الانف nasal secretion مع القشع لانه يسبب تلوث النموذج وعدم دقة النتائج ، كما يجب ان تتم معاملة النموذج بسرعة ولفترة لاتزيد عن ساعتين وذلك بفحص القشع مجهريا باستخدام 10% KOH او تستخدم مادة (N-acetyl-L cystine) كمذيب للقشع لاعطاء نتائج افضل ويزرع القشع على وسط SGA او SGA +C ويحضان بدرجة 37° م .

يمكن ايضا فحص عينات الادرار او افرازات المهبل وتعامل بنفس الطرق السابقة. حيث يطلب من المريض جمع عينات الادرار بعد اهمال الدفعة الاولى منه في وعاء طبي معقم ثم يؤخذ جزء قليل منه بانبوبة اختبار نظيفة وتوضع بجهاز الطرد المكزي لمدة دقيقتين بعدها يسكب الراشح وتؤخذ قطرات من الراسب وتفحص مجهريا لمشاهدة التراكيب الفطرية المختلفة. اما الافرازات المهبلية فتجمع باستخدام مسحات معقمة وتفحص كما مر سابقا في فقرة القيح القليل.

	السيرة الذاتية والعلمية أ.د. إنعام محمود نجم الربيعي دكتوراه، استاذ دكتور قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة البصرة، البصرة، العراق		
المعلومات الشخصية			
• الاسم	أ.د. إنعام محمود نجم الربيعي		
• المواليد	1974/09/11		
• مكان الولادة	البصرة، العراق		
• الجنس	انثى		
• الجنسية	عراقية		
• الحالة الزوجية	متزوجة		
• عدد الأطفال	0		
• رقم الهاتف الجوال	07801084928		
المعلومات الأكاديمية			
• اللقب العلمي	استاذ دكتور		
• القسم العلمي	قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة البصرة		
• التخصص العام	علم الاحياء المجهرية		
• التخصص الدقيق	علم الفطريات		
• البريد الإلكتروني	inaam.najem@uobasrah.edu.iq inaam_alrubayae@yahoo.com		
• بوابة البحث العلمي	https://www.researchgate.net/profile/Inaam-Alrubayae		
• الباحث العلمي	https://scholar.google.com/citations?user=Vy6Hx3AAA-AAJ&hl=en		
• ORCID	0000-0003-43930-1579		
التحصيل الدراسي			
الشهادة	السنة	التخصص	الجهة المانحة
• دكتوراه	2012/12/13	فطريات طبية	كلية العلوم – جامعة البصرة - العراق
• ماجستير	2001/12/31	بايولوجي /فطريات	كلية العلوم – جامعة البصرة - العراق
• بكالوريوس	1998	علوم / علوم حياة	كلية العلوم – جامعة البصرة- العراق
س			
الألقاب العلمية			
• مدرس مساعد	2002 / 7 / 3		
• مدرس	2007 / 10 / 30		
• أستاذ مساعد	2015 / 8 / 9		
• أستاذ	2020 /12 /6		

الفصل الثامن

طرق فحص الخلايا والأنسجة النباتية

أ.م.صادق صبيح كريم الطائي

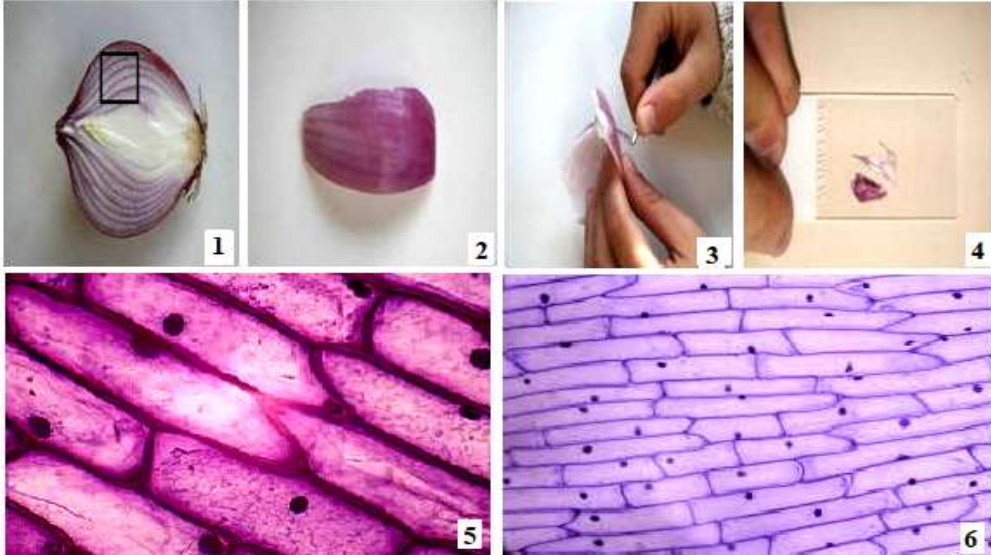
تتطلب دراسة التركيب الداخلي للخلية النباتية وكيفية انتظامها عمل قطاعات رقيقة تصل إلى عدة ميكرونات ، ويتم ذلك عادةً بطريقة يدوية وذلك من خلال تحضير بعض الشرائح في المختبر ويتم من خلال:

أولاً: تحضير شرائح بسيطة ومؤقتة للأوراق الرقيقة من البصل (من السطح المقعر للأوراق اللحمية الطرية من البصل) وتتلخص بما يلي:

1- خذ شريحة زجاجية نظيفة وجافة وضع عليها قطرة ماء مقطر في وسط الشريحة.

2- ضع جزء صغير من البشرة الغشائية الورقية في تلك القطرة وبلطف ومن ثم ضع قطرة من السفرانين المحضر بأذابة 1 غم من الصبغة وتدويها باستخدام 100مل من الماء المقطر، ثم ضع غطاء الشريحة بوضع مائل (45) بالقرب من القطرة ماسكاً الغطاء باليد اليسرى ثم ضع ابرة التشريح تحت الجهة الثانية من الغطاء البعيد عن الشريحة اخفض الغطاء تدريجياً وذلك بسحب الابرة إلى ان يقع الغطاء فوق القطرة فيغطيها تفادياً لتكون الفقاعات الهوائية، يجب التخلص من الماء الزائد الذي يسيل مقدار من خارج غطاء الشريحة وذلك بالاستعانة بورق النشاف، اما اذا طفح جزء من الماء فوق غطاء الشريحة فيجب ابدال الغطاء واعادة العملية مجدداً او ابدال الغطاء وإزالة الماء الزائد بواسطة ورق النشاف .

3- تفحص العينة تحت القوى الصغرى للمجهر ثم يدرس بالتفصيل تحت القوى الكبرى لغرض تعريف الطالب على الخلايا مميزاً الاجزاء الرئيسية فيها كجدار الخلية والبروتوبلاست والنواه (شكل 1-8) .



شكل (1-8) يوضح خطوات عمل شريحة بصل مؤقتة.

- 1- تحديد مكان أخذ العينة 2 - اختيار مقطع من البصل 3- إزالة البشرة الشفافة للبصل 4- وضع العينة على الشريحة الزجاجية 5- فحص العينة على قوى 40 X 6- فحص العينة على قوى 10X.
- ثانياً: تحضير الخلايا الاعتيادية للبشرة في الأوراق النباتية (شكل 2-8).

يتم من خلالها تحضير مكونات البشرة في الأوراق باستخدام محلول جفري والذي يعمل على فصل سطح البشرة العليا عن البشرة السفلى لغرض دراسة خلايا البشرة الاعتيادية والثغور في أوراق النباتات ويتم ذلك باستخدام الخطوات الآتية:

- 1- خذ قطعة من منتصف الورقة بضمنها العرق الوسطي والعروق الثانوية وحافة الورقة.
- 2- تغمر القطع في محلول جفري Jeffrey solution المتكون من حجمين متساويين من 10% محلول ثالث اوكسيد الكروم وحامض النتريك المركز بدرجة حرارة الغرفة.
- 3- ترفع بعدها القطع من المحلول وتغسل بالماء المقطر حتى انفصال البشريتين عن النسيج المتوسط.
- 4- تصبغ البشرة بصبغة السفرانين المحضر من اذابة 1 غم من الصبغة مذابة في 100 مل من الماء المقطر، لمدة 24 ساعة.
- 5- تغسل البشرة المسلوخة بالماء المقطر عدة مرات، ومن ثم تحمل العينة على شريحة زجاجية نظيفة بواسطة الكليسرين النقي وتغطى بغطاء الشريحة.
- 6- تفحص العينات تحت المجهر الضوئي والتي تظهر كما في الشكل (2-8).



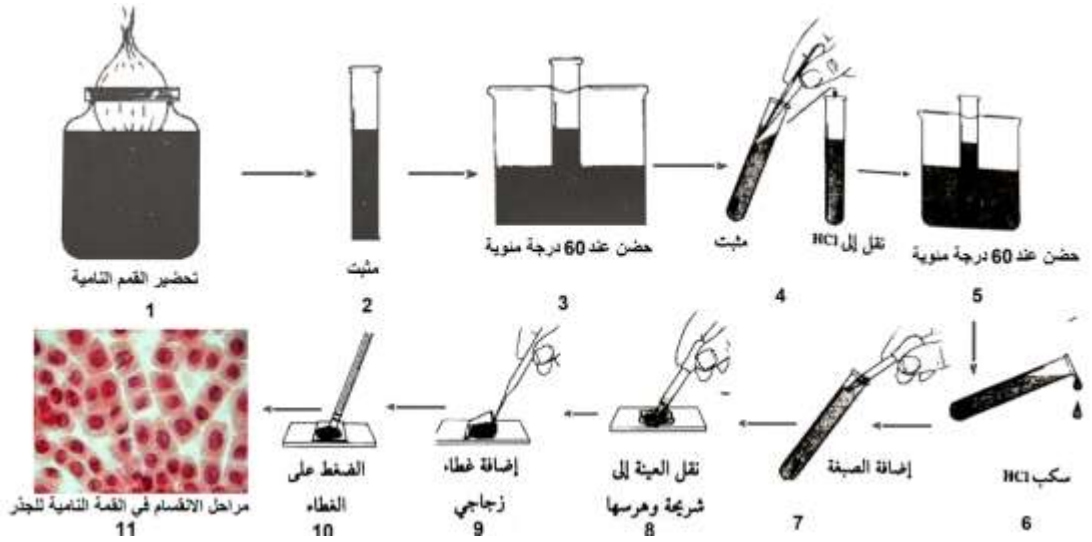
شكل (2-8) خلايا البشرة الاعتيادية والثغور محضرة باستخدام محلول جفري

ثالثاً: طريقة الهرس Squashing

هي الطريقة المثلى لفصل الخلايا عن بعضها عبر تفكك المادة بين الخلوية، عادةً تعمل شرائح دائمة وموقّعة بهذه الطريقة، ومن الأنسجة التي تحضر بهذه الطريقة القمة النامية للسيقان والجذور والبراعم الزهرية والمبايض والأوراق التوجيهية. وتمتلك القمم النامية في الجذور وسيقان النباتات وكذلك براعم الأزهار والأوراق الناشئة نسبة مرتفعة من الخلايا التي تمر بالانقسام المتساوي Mitosis، وذلك كمؤشر على نشاطها وانخراطها القوي في نمو الأعضاء النباتية. تعتبر طريقة الهرس أو الدعك سهلة وسريعة وتحضر الهرسة وصبغها لقمة جذر البصل كالآتي:

- 1- خذ بصلة واقطع جذورها الجافة بشفرة حادة.
- 2- ضع البصلة على فوهة كأس زجاجية ممتلئة بالماء، يتم غمر منطقة الجذور فقط في الماء (شكل 3-8).
- 3- بعد يومين أو ثلاثة لاحظ بدايات الجذور الجديدة التي تظهر بلون أبيض، اقطع بشفرة حادة قمم الجذور وبطول لا يزيد عن 2 ملم.
- 4- اقطع القمم طولياً وضعها في انبوبة اختبار حاوية كحول اثيلي 70 % ثم انقل الانبوبة إلى حمام مائي عند حرارة 60 °م لمدة 15 دقيقة (شكل 3-8).

- 5- انقل قطع القمم النامية إلى انبوب يحتوي على حمض هيدروكلوريك (يحضر بإضافة 10 مل من الحامض المركز إلى 30 مل من كحول تركيزه 95 %) ثم انقل الانبوب ومحتوياته إلى حمام مائي عند حرارة 60 °م.
- 6- اسكب محلول الحامض واضف محلول صبغة الاسيتوكارمين ثم اترك الجذور في هذا المحلول لمدة 15-20 دقيقة.
- 7- انقل قمة جذر إلى شريحة نظيفة، راعي ان تكون القمة مغمورة بمحلول الصبغة لاجراء عملية الهرس بدون فقاعات هواء تحت الغطاء الزجاجي.
- 8- غط القمة بغطاء زجاجي نظيف، وانزله برفق لتحاشي ظهر فقاعات هوائية. ثم اضغط على الغطاء الزجاجي بمؤخرة قلم رصاص او بالطرف الخشبي المسطح لابرء التشريح حتى تنفرد خلايا القمة.
- 9- افحص التحضير بالعدسة الشبئية الصغرى، والقوى الكبرى باستخدام العدسة الزيتية، تأكد من نظافة العدسات قبل استعمالها، كذلك اضبط اضاءة المجهر حتى تشاهد مراحل الانقسام بوضوح، راعي ان تكون درجة الاضاءة مناسبة مع قوة تكبير العدسة.



شكل (3-8) تحضير وتثبيت القمم النامية في جذور البصل.

رابعاً: تحضير المقاطع الدائمة والمؤقتة للعينات النباتية:

أولاً:"استخدام طريقة التقطيع باستخدام المايكروتوم Microtomes لغرض تحضير المقاطع وكما يلي :

1- جمع العينات: وتشمل جمع العينات النباتية من الحقل.

2- تثبيت العينات Fixation

تمثل الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة النباتية لغرض الحفاظ على النسيج ومحتوياته الداخلية وإيقاف عملية التحلل الذاتي للنسيج بفعل الانزيمات ويتم تثبيت العينات بأخذ اجزاء من السيقان والاوراق (منطقة العرق الوسطي) وتثبت الاجزاء في مثبت

(FAA) (5 فورمالين : 5 حامض الخليك: 90 مل من كحول اثيلي بتركيز 70%) لمدة 24 ساعة.

3- الغسل Washing

تغسل العينات بعد التثبيت لغرض إزالة ما تبقى من أثر المثبت على العينة وذلك بأن تغسل العينة ثلاث مرات باستخدام كحول اثيلي 70%.

4- نزع الماء من العينة Dehydration

وهي طريقة لإحلال مادة محل الماء الموجود بالنسيج ويتم ذلك بأن توضع العينة في قناني زجاجية صغيرة وتمرر في سلسلة متصاعدة من الكحول الاثيلي (80%، 90%، 95%) لمدة ساعة واحدة في كل تركيز ثم في كحول اثيلي مطلق 100% لمدة ليلة واحدة.

5- ترويق العينة Clearing

لأن الكحول المستخدم لا يمتزج مع شمع البرافين ؛ تستخدم مادة مروقة تذوب في الكحول وشمع البرافين لغرض جعل النسيج شفافاً" ويستخدم لهذا الغرض مادة الزايلين وذلك بنقل العينة إلى مزيج من كحول مطلق: زايلين بنسبة (3: 1، 1: 1، 1: 3) لمدة 45 دقيقة او ساعة في كل مزيج. ثم تترك العينات في الزايلين النقي لمدة 30 دقيقة.

6- التشريب Infiltration

يمثل إحلال المادة المستخدمة في الطمر(البرافين) محل المادة المروقة. ويستخدم لهذا الغرض البرافين لكونه يتخلل العينة بسرعة ودون أحداث ضرر في تركيبها النسيجي كما أنه يعمل على حفظ العينة لفترات طويلة دون تغيير، كما يكسب العينة الصلابة لتهيئتها للقطع باستخدام الميكروتوم. ويتم ذلك بوضع خليط من كل من الزيلين وشمع البرافين في فرن بدرجة حرارة 60 درجة مئوية ولمدة أربع ساعات، ثم تنقل إلى شمع البرافين وتترك لمدة ليلة واحدة في درجة الحرارة نفسها.

7- الطمر Embedding

يتم صب برافين جديد محضر تحت درجة الحرارة السابقة في مكعبات بلاستيكية خاصة ثم توضع النماذج النباتية داخل المكعبات، ثم تترك لتبرد تحت الماء البارد لمدة ليلة كاملة وبذلك تصبح النماذج جاهزة للتقطيع.

8- التشذيب Trimming

يفضل تشذيب القوالب الشمعية بشفرة حادة حتى تصبح العينة في وضع مناسب للتقطيع.

9- التقطيع Sectioning

تثبت العينة على حامل العينة المايكروتوم (شكل 4-8) وتقطع النماذج بواسطة المايكروتوم بسمك 10-20 مايكروميتر بشكل مقاطع متسلسلة (أشرطة)، ثم تسطح على ماء بدرجة حرارة 30-45 درجة مئوية ثم تحمل على شرائح زجاجية نظيفة مطلية بقليل

من زلال ماير ومن ثم توضع على صفيحة ساخنة عند درجة حرارة 30-45 درجة مئوية لمدة ليلة كاملة.

10- الترويق

تروق العينات بوضعها في الزايلين ليلة كاملة ثم تمرر بسلسلة متنازلة من الكحول الايثيلي (100%، 95%، 90%، 80%، 70%) لمدة عشر دقائق في كل منها لغرض أعدادها للتصبغ.

11- التصبغ Staining

تصبغ العينات بوضعها في صبغة السفرانين (ويتم تحضيرها بإذابة 1 غم في 100 مل من ماء المقطر) بتركيز 70% لمدة ليلة كاملة تمرر العينات بسلسلة متصاعدة من الكحول الايثيلي (70%، 80%، 90%، 95%، 100%) ومن ثم توضع في صبغة الاخضر السريع Fast green (المحضر بإذابة 1 غم من الصبغة في 100 مل من الكحول الايثيلي المطلق) لمدة 15 ثانية. بعدها تغسل الشرائح جيدا بكحول ايثيلي مطلق وتمرر بالزايلين التنظيف لمرتين متتاليتين لمدة 5 دقائق في كل مرة ثم تعرض للهواء لكي تجف.

12- تحميل الشرائح Mounting

تحمل المقاطع (الأشرطة) على شريحة زجاجية بعد إضافة مادة التحميل وذلك بوضع قطرات من بلسم كندا Canada balsam ثم تغطي بغطاء الشريحة ويوضع الغطاء برفق ومن ثم تنقل الشريحة إلى صفيحة ساخنة بدرجة حرارة الغرفة بدرجة حرارة 60 ° م لمدة 4 ساعات.

13- التعليم Labeling

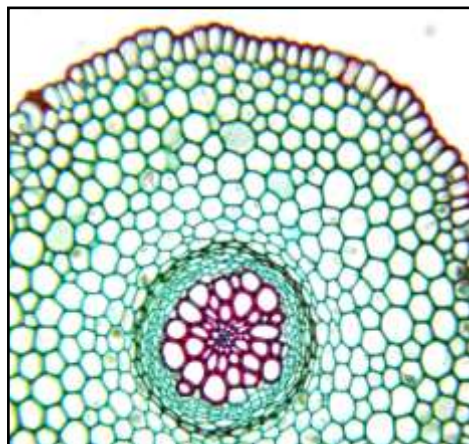
توضع ورقة لاصقة على الشريحة مدوناً عليها معلومات عن العينة، وبذلك تصبح الشرائح جاهزة للفحص والدراسة (الشكل 5-8).



شكل (4-8) جهاز المشراح الدوار microtome



ب



أ

شكل (5-8) مقاطع نسيجية محضر بطريقة التقطيع بجهاز المشرع الداور
.Micrtome

أ- ساق نباتي ب- ورقة نباتية.

ثانياً: التقطيع باليد Hand sectioning

تستخدم طريقة التقطيع باليد لتحضير شرائح دائمية أو مؤقتة وكما يأتي:

- 1- تؤخذ العينة من الحقل وتثبيت بمحلول التثنية (F.A.A.) لمدة 24 ساعة .
- 2- تغسل العينة بكحول ايثيلي 70% ثلاثة مرات وتحفظ بالكحول 70% لحين الاستعمال .
- 3- تقطع العينة باليد بواسطة شفرة حادة إلى مقاطع رقيقة جداً.
- 4- تصبغ المقاطع بصبغة السفرانين المحضرة لمدة 1- 2 ساعة.
- 5- تنتقل المقاطع بعد ذلك إلى كحول ايثيلي بتركيز 70% لمدة دقيقتين لإزالة الصبغة الزائدة.
- 6- ثم تنتقل المقاطع إلى كحول محمض (1سم³ من حامض الهيدروكلوريك او النتريك او الخليك المركز إلى 99 سم³ من كحول 70%) لمدة دقيقتين.
- 7- تنتقل المقاطع بعد ذلك إلى كحول ايثيلي بتركيز 90 % لمدة دقيقتين.
- 8- تصبغ المقاطع بصبغة الاخضر الثابت لمدة ثوان قليلة.
- 9- تنتقل المقاطع إلى كحول ايثيلي 96 % لمدة دقيقتين.
- 10- يستبدل الكحول السابق بكحول مطلق مرتين ولمدة دقيقتين لكل مرة.

11- تنقل المقاطع بعدها إلى مزيج من الكحول المطلق والزايلين بنسبة حجمية 1:1 لمدة دقيقتين.

12- يستبدل المزيج السابق بالزايلين النقي مرتين ولمدة دقيقتين لكل مرة.

13- ثم توضع المقاطع على شريحة زجاجية وتحمل بكليسرين أو كندا بلسم ومن ثم يوضع غطاء الشريحة وتترك على صفيحة ساخنة بدرجة حرارة 40 - 45 °م لحين جفافها.

المصدر

السعدي ، سحر عبدالعباس مالك و الطائي، صادق صبيح كريم (2020) . كتاب تشريح النبات العملي . دار الكتب للطباعة والنشر -جامعة البصرة . ص4-11 .

السيرة الذاتية والعلمية

المعلومات الشخصية



الاسم الثلاثي واللقب : صادق صبيح كريم الطائي

مكان الميلاد : ميسان

تاريخ الميلاد : 1987/10/24

الجنسية : عراقية

الحالة الاجتماعية : متزوج

العنوان الحالي : ميسان/ العمارة / الحي الجامعي 2 قرب

كلية العلوم والهندسة/ جامعة ميسان

رقم الموبايل : 07726582018

البريد الالكتروني : s,sadeq_altaie@yahoo.com

as_altti@uomisan.edu.iq

الانتماء الأكاديمي

الجامعة الحالية : ميسان الكلية : العلوم القسم : علوم الحياة

اللقب العلمي : أستاذ مساعد التخصص العام: علوم الحياة

التخصص الدقيق : تصنيف نبات وتشريح نبات

الحصول على لقب استاذ مساعد لسنة 2023

المؤهلات الأكاديمية

ت	الشهادة	الجامعة	تاريخ منحها
1	البكالوريوس	قسم علوم الحياة / كلية العلوم/جامعة البصرة	2009/2008
2	الماجستير	قسم علوم الحياة / كلية العلوم/جامعة البصرة	2015/2014
3	دكتوراه فخرية	جامعة ديانا إنتل البريطانية	2021

تاريخ العمل

مكان العمل	الفترة من - الى	عنوان العمل (المرتبة العلمية)	طبيعة العمل
كلية العلوم/جامعة ميسان	2010 - 2012	مساعد مختبر	مساعد مختبر
كلية العلوم/جامعة ميسان	2014 - 2018	مدرس مساعد	تدريسي
كلية العلوم/جامعة ميسان	2018 /	مدرس	تدريسي

الكتب المؤلفة

1- كتاب تشريح النبات العلمي (2020)

الفصل التاسع

المجهر الإلكتروني Electron microscope

صادق صبيح كريم الطائي

رفل فراس جابر

هو أدقّ مجهر اخترع وعرف حتى اليوم، يعتمد الفيزيائيون للنظر في داخل الذرة،

حيث تقوم حزمة من الإلكترونات بدلا من شعاع الضوء لإعطاء صورة مكبرة للعيينة. ان المجاهر الإلكترونية أقوى بكثير من المجاهر الضوئية. ويرجع ذلك إلى أن طول الموجة المقترنة بالإلكترون أقصر بكثير من طول موجة الضوء المرئي. ويمكن لبعض المجاهر الإلكترونية أن تظهر حتى محيط ذرات منفصلة في إحدى العينات، يقوم المجهر الإلكتروني النافذ بإرسال حزمة من الإلكترونات عبر شريحة عينة رقيقة جداً، فيما تقوم عدسات مغناطيسية بتكبير الصورة وضبطها ورؤيتها على شاشة أو تسجيلها على لوح فوتوغرافي . ويكبر المجهر الإلكتروني النافذ الأشياء حتى 200.000 مرة، لكن من سلبياته أنه لا يمكن استخدامه لمشاهدة العينات وهي حية.

أما المجهر الإلكتروني الماسح فيزودنا بصور مجسمة مذهشة كالتّي تراها في الصورة ب. لا ضرورة لتقطيع العينة إلى شرائح من أجل رؤيتها، إنما يكفي رشها بطلاء معدني رقيق. ترسل حزمة من الإلكترونات لتسقط على سطح العينة، مما يدفع الطلاء المعدني إلى إطلاق وابل من الإلكترونات نحو شاشة فلورية أو لوحة تصوير فوتوغرافي، فتعطي صورة مكبرة لسطح الشيء. تستطيع المجاهر الإلكترونية الماسحة تكبير الأشياء حتى 100.000 مرة. ولا يمكن استخدامها لمشاهدة العينات وهي حية، كما هي الحال بالنسبة للمجهر الإلكتروني النافذ.

تم اختراع المجهر الإلكتروني وتسليم أول براءة اختراع للعالم الفيزيائي الهنغاري ليو زيلارد الذي رفض صنعه. وبدلاً من ذلك، قام الفيزيائي الألماني إرنست روسكا والمهندس الكهربائي ماكس نول بصنع النموذج الأولي للمجهر الإلكتروني في عام 1931 بقدرة 400 طاقة تكبير، كان الجهاز تطبيقاً عملياً وفعالاً لمبادئ الإلكترون المجهرية. بعد ذلك بعامين، في عام 1933، بنى روسكا المجهر الإلكتروني الذي تجاوز الدقة التي بلغها مع مجهر بصري (عدسات). وعلاوة على ذلك، حصل راينولد ردينبيرغ مدير شركة سيمنز-سكاكيرتويرك على براءة اختراع للمجهر الإلكتروني في أيار/مايو 1931. اضطرت الأمراض العائلية إلى اختراع المجاهر الكهربائية وذلك لجعل الفيروسات مثل شلل الأطفال مرئية.

يتميز المجهر الإلكتروني بتكبير أكبر بكثير عن التكبير الذي تصل إليه المجاهر الضوئية. وترجع تلك الكفاءة إلى أن المجهر الإلكتروني يستخدم شعاعاً من الإلكترونات، ويستفيد من ازدواجية الإلكترون كجسيم وموجة في نفس الوقت (ازدواجية موجة-

جسيم). ويقوم المجهر بمعالجة شعاع الإلكترونات كما لو كان شعاعاً ضوئياً مع الفارق أن المجهر الإلكتروني يستعمل عدسات مغناطيسية لتخزين وضبط شعاع الإلكترونات بدلاً من العدسات الضوئية التي يستعملها المجهر الضوئي المعتاد. ونظراً لأن الإلكترونات لها طول موجة أقصر نحو 100.000 مرة من طول موجة الضوء العادي ففي استطاعتها رؤية أشياء أصغر بكثير عما "يراه" المجهر العادي. وتبلغ تكبير المجهر الإلكتروني نحو 2.000.000 مرة بينما يبلغ أقصى تكبير للمجهر الضوئي نحو 2000 مرة فقط.

المجهر الإلكتروني الماسح Scanning electron microscope (SEM)

مجهر المسح الإلكتروني أو المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) هو أحد أنواع المجهر الإلكتروني الذي ينتج صوراً للعينة عن طريق مسح السطح بحزمة مركزة من الإلكترونات. تتفاعل الإلكترونات مع الذرات في العينة ، وتنتج إشارات مختلفة تحتوي على معلومات حول تضاريس السطح وتكوين العينة. يتم مسح الشعاع الإلكتروني في نمط المسح النقطي ، ويتم دمج موضع الحزمة مع شدة الإشارة لإنتاج صورة. حيث يتم رصد الإلكترونات الثانوية المنبعثة من الذرات التي تثيرها الشعاع الإلكتروني باستخدام كاشف إلكتروني ثانوي (كاشف Everhart-Thornley).



شكل (9-1) المجهر الإلكتروني الماسح.

الإشارات التي يستخدمها مجهر المسح الإلكتروني لإنتاج صورة ناتجة عن تفاعلات شعاع الإلكترون مع الذرات في أعماق مختلفة داخل العينة. يتم إنتاج أنواع مختلفة من الإشارات بما في ذلك الإلكترونات الثانوية (SE) والإلكترونات المنعكسة أو المتناثرة (BSE) والأشعة السينية المميزة والضوء (التلألؤ الكاثودي) (CL) والتيار الممتص (تيار العينة) والإلكترونات المنقولة. تعتبر أجهزة الكشف الإلكترونية الثانوية معدات قياسية في جميع أنواع المجهر الإلكتروني الماسح SEMs ، ولكن من النادر أن يكون لآلة واحدة أجهزة كشف لجميع الإشارات المحتملة الأخرى.

مبدأ عمل المجهر الإلكتروني الماسح:

يقوم مبدأ المجهر الماسح الإلكتروني على توجيه سيل من الإلكترونات ينطلق من مدفع الإلكترونات على العينة المراد فحصها، بحيث يمر هذا الشعاع بمرحلتين من التركيز أو التكثيف ليتم تجميعه في نقطة لا يتجاوز قطرها بضعة نانومترات باستخدام عدسات التركيز. و من ثم يقوم بعملية مسح scan للعينة من أعلى لأسفل و من اليمين لليسار كما لو أنك تكتب بهذا القلم على ورقة. يتم توجيه الشعاع على العينة باستخدام ملفات التوجيه التي تحرك الشعاع بخطوة لا تزيد أيضا عن بضعة نانومترات.. و عندما يقوم سيل الإلكترونات المركز بضرب العينة في كل نقطة نحصل على عدّة انبعاثات تعتمد على طبيعة المادة .. و من ثم نقوم بجمع هذه الانبعاثات و عدّها .. و بعدها نعطي لكل مربع تم مسحه درجة لون معين بين الابيض و الاسود .. بحيث تتناسب شدة البياض مع عدد الانبعاثات التي تم تسجيلها في كل مربع.. و هذه الانبعاثات تعطي معلومات مختلفة عن العينة و كل منها تفيد في نوع معين من الدراسات .. و هذه الانبعاثات الناتجة عن صدم العينة بالإلكترونات هي:

1- **الإلكترونات الثانوية Secondary Electrons:** عندما يمر سيل الإلكترونات الذي يقذفه المجهر خلال العينة .. تتحرر بعض الإلكترونات من ذرات العينة نتيجة هذا التصادم و تنبعث من سطح العينة.. فيتم التقاطها و عدّها واحدا واحدا (تقريبا) .. لاحظ ان المواد التي تحوي الكثير من الإلكترونات كالذهب ستطلق الكثير من الإلكترونات الثانوية (و ستبدو اكثر بياضا) بينما المواد العازلة او قليلة الإلكترونات الحرة ستطلق عددا اقل (و ستبدو اكثر سوادا) .. و هذه هي اهم الإلكترونات لعمل هذا المجهر.

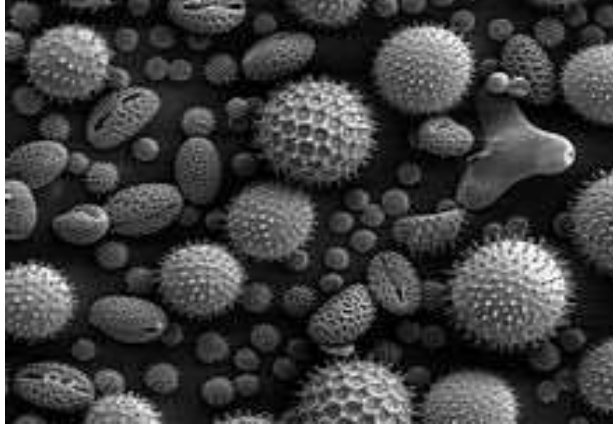
2- **الإلكترونات المرتدة Back-Scattered Electrons:** الإلكترونات التي يقذفها المجهر بطاقة عالية قد ترتد من سطح العينة .. و يتم التقاطها و عدّها ايضا .. فالذرات الكبيرة ستؤدي الى ارتداد عدد اكبر من هذه الإلكترونات .. بينما الذرات الصغيرة ستقوم بالعكس.. و كلما زاد حجم ذرات العينة (زاد عدد الكترونها و بروتونها) زاد عدد الإلكترونات المرتدة و بالتالي ستبدو اكثر بياضا.

3- **الاشعة السينية أو أشعة إكس x-rays:** تعطي معلومات دقيقة عن نوع المواد في العينة.. أي أنواع الذرات و العناصر بدقة و ليس شكل سطح العينة.

4- **الضوء (الفوتونات) Luminescence** : تنطلق الفوتونات من المواد نتيجة تهيج الكترونات الى مدارات طاقة عليا نتيجة التصادم .. هذا الضوء يعطينا معلومات كثير مثل نوع المادة و مقدار قوى الشد و الضغط عليها مثلا.

5- **تيارات العينة Sample Current**: عند قذف سيل من الإلكترونات داخل العينة تنشأ تيارات كهربائية داخل العينة نفسها.. كأنها اصيبت بماس كهربائي .. و هذا التيار ضروري لعمل المجهر الماسح الالكتروني .. لأنه اذا لم تكن المادة موصلة للتيار.. ستتجمع الشحنات الكهربائية السالبة الساكنة على سطح العينة.. ولان الشحنات المتشابهة تتنافر .. فان هذه الشحنات على سطح العينة ستقوم بنفر شعاع الالكترونات الساقط عليها الذي نستخدمه للتصوير .. و ستقوم بتشويش الصورة.

نظراً لشعاع الإلكترون الضيق جداً ، يتمتع المجهر الالكتروني الماسح SEM بعمق كبير في المجال مما يعطي مظهرًا مميزًا ثلاثي الأبعاد مفيدًا لفهم البنية السطحية للعينة ، ويتجلى ذلك في صورة مصغرة لحبوب اللقاح الموضحة ادناه. هناك مجموعة واسعة من التكبيرات ممكنة ، من حوالي 10 مرات (تقريبًا ما يعادل عدسة يدوية قوية) إلى أكثر من 500000 مرة ، حوالي 250 ضعف حد التكبير لأفضل مجاهر ضوئية.



شكل (2-9) لحبوب اللقاح مأخوذة بواسطة المجهر الالكتروني الماسح

تحضير العينات Sample preparations

يجب أن تكون عينات SEM صغيرة بما يكفي لتناسب مرحلة العينة ، وقد تحتاج إلى إعداد خاص لزيادة الموصلية الكهربائية وتثبيتها ، بحيث يمكنها تحمل ظروف الفراغ العالية وشعاع الإلكترونات عالي الطاقة. عادة ما يتم تثبيت العينات بشكل محكم على حامل العينة باستخدام مادة لاصقة موصلة. يستخدم المجهر الالكتروني الماسح SEM على نطاق واسع لتحليل العيوب في رقائق أشباه الموصلات ، ويصنع المصنعون أدوات يمكنها فحص أي جزء من رقاقة أشباه الموصلات مقاس 300 مايكرومتر. تحتوي العديد من الأدوات على غرف يمكنها إمالة جسم بهذا الحجم إلى 45 درجة وتوفر دورانًا مستمرًا 360 درجة.

تقوم العينات غير الموصلة بجمع الشحنة عند مسحها بواسطة الشعاع الإلكتروني ، وخاصة في وضع التصوير الإلكتروني الثانوي ، مما يؤدي إلى أخطاء في مسح الصورة. للتصوير التقليدي في المجهر الإلكتروني الماسح SEM ، يجب أن تكون العينات موصلة للكهرباء ، على الأقل على السطح ، ومؤرخًا كهربائيًا لمنع تراكم الشحنة الكهربائية الساكنة. تتطلب الأشياء المعدنية القليل من التحضير الخاص للمجهر الإلكتروني الماسح SEM باستثناء التنظيف والتركيب الموصل إلى كعب العينة. عادة ما تكون المواد غير الموصلة مغلفة بطبقة فائقة الرقة من مواد موصلة للكهرباء ، وترسب في العينة إما عن طريق طلاء بخاخ مفرغ هوائيا جزئيا أو عن طريق التبخر المفرغ هوائيا كلياً.

تشمل المواد الموصلة المستخدمة حالياً لطلاء العينات الذهب وسبائك الذهب والبلاديوم والبلاتين والإيريديوم والتنتستن والكروم والأوزميوم والجرافيت. قد يزيد الطلاء بالمعادن الثقيلة من نسبة الإشارة / الضوضاء للعينات ذات العدد الذري المنخفض.

يمكن تصوير عينات غير موصلة بدون طلاء باستخدام وضع المجهر الإلكتروني الماسح البيئي (ESEM) أو وضع الجهد المنخفض لتشغيل المجهر الإلكتروني الماسح SEM. في أدوات ESEM ، يتم وضع العينة في غرفة ذات ضغط مرتفع نسبياً ويتم ضخ العمود البصري للإلكترون بشكل مختلف للحفاظ على الفراغ بشكل كافٍ منخفضاً في البندقية الإلكترونية. تحديد منطقة الضغط العالي حول العينة في ESEM الشحنة وتوفر تضخيماً للإشارة الإلكترونية الثانوية. عادة ما يتم إجراء SEM منخفض الجهد في أداة مزودة بمدافع انبعاث ميداني (FEG) قادرة على إنتاج سطوع إلكترون أولي عالي وحجم صغير حتى عند أماكن التسارع المنخفضة. لمنع شحن العينات غير الموصلة ، يجب تعديل ظروف التشغيل بحيث يكون تيار الشعاع الوارد مساوياً لمجموع تيارات الإلكترونات الثانوية والثانوية الصادرة.

العينات الحياتية Biological samples

بالنسبة للمجهر الإلكتروني الماسح SEM ، يلزم عادة أن تكون العينة جافة تماماً ، لأن غرفة العينة في فراغ عالي. يمكن فحص المواد الصلبة والجافة مثل الخشب والعظام والريش والحشرات المجففة أو الأصداغ (بما في ذلك قشور البيض) ، ولكن الخلايا والأنسجة الحية والكائنات الحية الناعمة تتطلب تثبيتاً كيميائياً للحفاظ على استقرار بنائها الخلوي.

عادة ما يتم التثبيت عن طريق وضعها في محلول مثبت كيميائي ، مثل الجلوترالدهيد ، وأحياناً بالاشتراك مع الفورمالديهايد والمثبتات الأخرى ، ويتبعه اختياريًا التثبيت بعد ذلك باستخدام رباعي أكسيد الأوزميوم ، ثم تجفف الأنسجة المثبتة. لأن تجفيف الهواء يتسبب في الانهيار والانكماش ، يتم تحقيق ذلك عادة عن طريق استبدال الماء في الخلايا بمذيبات عضوية مثل الإيثانول أو الأسيتون ، واستبدال هذه المذيبات بدورها بسائل

انتقالي مثل ثاني أكسيد الكربون السائل عن طريق التجفيف الحرج. تتم إزالة ثاني أكسيد الكربون أخيرًا أثناء وجوده في حالة فوق الحرجة ، بحيث لا توجد واجهة بين الغاز والسائل داخل العينة أثناء التجفيف.

عادة ما يتم تثبيت العينة الجافة باستخدام مادة لاصقة مثل راتنجات الايبوكسي أو الشريط اللاصق ذو الوجهين الموصلة كهربائيًا ، والغطاء المغلف بذهب أو سبائك الذهب / البلاتينوم قبل الفحص في المجهر. قد يتم تقسيم العينات (مع مشراح دقيق) إذا كان سيتم الكشف عن معلومات حول البنية التحتية الداخلية للكائن الحي للتصوير.

إذا كان SEM مجهزًا بمرحلة باردة من أجل الفحص المجهرى بالتبريد ، يمكن استخدام التثبيت بالتبريد ويتم إجراء الفحص المجهرى الإلكتروني المجري بدرجات حرارة منخفضة على العينات المثبتة المبردة. قد يتم كسر العينات المثبتة بالتبريد تحت التفريغ لذلك يتم استخدام جهاز خاص للكشف عن البنية الداخلية، حيث يستخدم المجهر الإلكتروني للمسح الضوئي بدرجات الحرارة المنخفضة (LT-SEM) أيضًا لتصوير المواد الحساسة للحرارة مثل الثلج والدهون.

قوة التكبير Magnifications

يمكن التحكم في التكبير في المجهر الإلكتروني الماسح SEM على مدى حوالي 6 أوامر من حوالي 10 إلى 3000000 مرة. على عكس المجاهر الضوئية والمجهر الإلكتروني النافذ، فإن تكبير الصورة في المجهر الإلكتروني الماسح SEM لا يعتمد على قوة العدسات الشيئية. قد تحتوي المجاهر الإلكترونية الماسحة SEMs على عدسات مكثفة وشيئية، ولكن وظيفتها هي تركيز الشعاع على بقعة، وليست صوير العينة. شريطة أن يتمكن مدفع الإلكترون من توليد شعاع بقطر صغير بما فيه الكفاية، يمكن لـ SEM من حيث المبدأ أن يعمل بالكامل بدون عدسات مكثفة أو شيئية، على الرغم من أنه قد لا يكون متعدد الاستخدامات أو يحقق دقة عالية جدًا. في SEM، كما هو الحال في الفحص المجهرى باستخدام المجهر الضوئي، ينتج التكبير من نسبة أبعاد البيانات النقطية في العينة والنقطية على جهاز العرض. بافتراض أن شاشة العرض ذات حجم ثابت، ينتج تكبير أعلى من تقليل حجم البيانات النقطية في العينة، والعكس صحيح. وبالتالي، يتم التحكم فيا لتكبير من خلال التيار الموفر لملفات المسح الضوئي، أو الجهد الموفر للألواح انحراف، وليس بواسطة قوة العدسة الشيئية.

أولاً : استخدام المجهر الإلكتروني الماسح لأغراض تصوير أنسجة حيوانية مختلفة

رفل فراس جابر

لغرض التصوير العينة نتبع الخطوات التالية :

1- **التثبيت** - تغمر العينة في 3٪ من جلوترالدهيد بعد ان تتم معايرته بمحلول منظم (بفر) 0.1 مولار بمحلول الفوسفات المنظم عند درجة حرارة الغرفة أو 4-0 درجة مئوية (2-4 ساعات ، بحد أقصى 24-48 ساعة).

2- **الغسل** - تشطف الأنسجة بمحلول منظم (بفر) 0.1 مولاري الرقم الهيدروجيني = 7.2 - (3 × 10 دقائق).

3- **ما بعد التثبيت** - تغمر العينة في 2٪ محلول رباعي أكسيد الاوزميوم: 0.25 غم OsO₄ في 12.5 مل 0.1 مولاري من محلول الفوسفات المنظم (6.25 مل M0.2 محلول فوسفات + 6.25 مل ماء مقطر).

4- **الغسل: تغسل** في 0.1 مولاري من محلول الفوسفات المنظم (بفر) = 7.2 (3 × 10 دقيقة).

5- **التجفيف**: يستخدم في محلول متدرج من الإيثانول أو الأسيتون في الماء - 30٪ ، 50٪ ، 70٪ (يمكن تخزين الأنسجة في 70٪ إيثانول) ، 80٪ ، 90٪ ، 96٪ ، 100٪ لمدة 5-15 دقيقة لكل منهما) ؛ 2 × 100٪ إيثانول أو أسيتون (15-30 دقيقة لكل منهما).

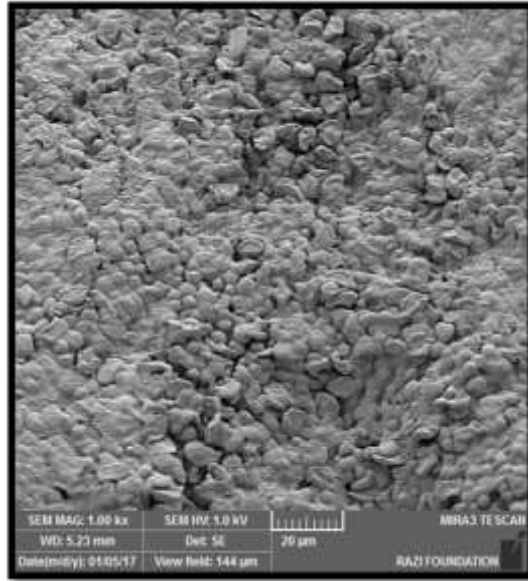
6- **التجفيف للنقطة الحرجة CPD**: تتضمن هذه العملية المعقدة ببساطة استبدال السائل في الخلايا بالغاز. تخلق هذه العملية عينة جافة تمامًا مع تشويه خلوي ضئيل أو معدوم.

7- **تحميل العينة**: الآن بعد أن تم تثبيت العينة المختارة وتجفيفها ، فإن الخطوة التالية هي تركيب العينة على عقب من الألمنيوم. غالبًا ما يكون العقب عبارة عن قطعة معدنية صغيرة ومسطحة مستديرة ذات ساق. الطريقة الأساسية للتعليق هي لصق العينة إلى العقب الذي تم تغطيته بشريط لاصق مزدوج الوجه وطبقة رقيقة من الرقاقة. الغراء عبارة عن غراء موصل فضي أو كربون خاص. نستخدم هذا للتأكد من أن العينة (غير الموصلة) سيتم تأريضها، وبالتالي ضمان تقليل شحن الإلكترون للعينة في غرفة المجهر الإلكتروني الماسح SEM.

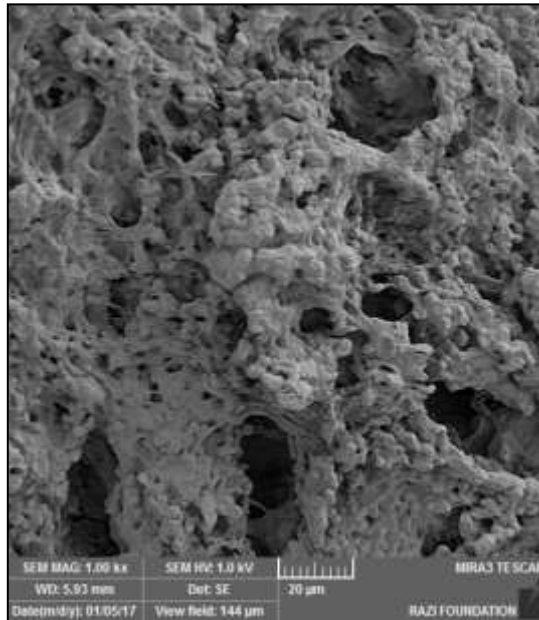
8- **طلاء المعدن**: الرشاش هو جهاز نستخدمه لطلاء العينات المركبة بالذهب قبل ادخالها إلى المجهر الإلكتروني الماسح SEM.

9- **عرض او فحص العينات في SEM**: المجهر الإلكتروني الماسح لديه شاشة نراقب منها نحن المشغلين العينة. الصورة مستمدة من الكشف عن الإلكترونات المثارة التي يتم ارتدادها من عينة الذهب بسرعات وإشارات متفاوتة. يلتقط الكاشفان إشارات الإلكترون وعبر عملية تحويل تناظري إلى رقمي ، يتم عرض الصورة على شاشة كمبيوتر ، أو يتم التقاطها على فيلم أبيض وأسود سلبي أو يتم تخزينها كصورة على محرك الأقراص الصلبة بجهاز الكمبيوتر.

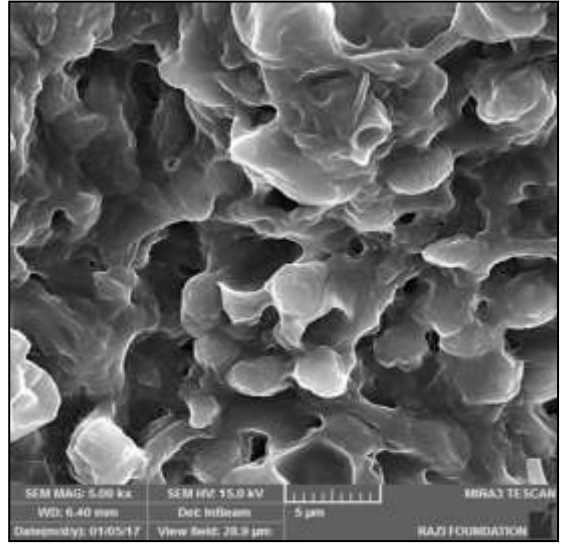
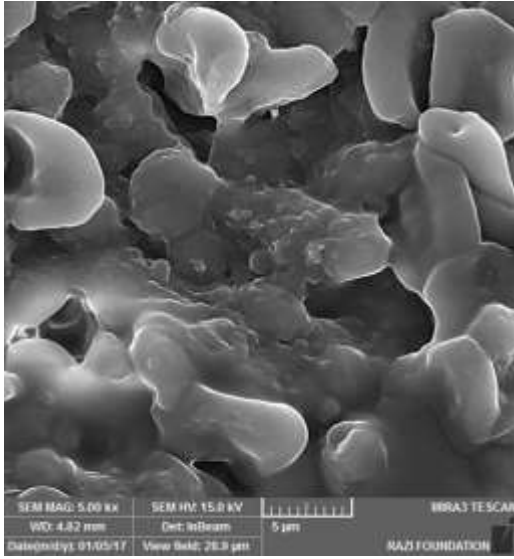
الصور ادناه مأخوذة بواسطة المجهر الالكتروني الماسح لنسيج الطحال:



(صورة 9-3): مظهر سطحي للطحال مأخوذ بواسطة المجهر الالكتروني الماسح (Rafel، 2018).



(صورة 9-4): مظهر سطحي للطحال مأخوذة بواسطة المجهر الالكتروني الماسح (Rafel، 2018).



(صورة 9-5): A و B توضحان الثغور الطحالية (Rafel، 2018).

ثانياً : استخدام المجهر الالكتروني الماسح لأغراض تصوير عينات نباتية مختلفة

يستخدم المجهر الالكتروني الماسح لغرض رؤية التفاصيل الدقيقة للعينات النباتية وخاصة الصغيرة منها والتي تتلخص كما يلي :

اولاً :فحص عينات الاوراق النباتية والبذور :

1- توضع العينة المراد دراستها على اسطوانة معدنية متخصصة (Metal stup) مغطاة بشريط ذي وجهين لاصقين (double sided cello tape) كما في اللوحة رقم (6-9)



لوحة (6-9) اسطوانة معدنية متخصصة Metal stup
2-تطلي الاسطوانات المعدنية بالذهب باستخدام جهاز طلاء sputtering chamber
بسمك 200 انكستروم . كما في اللوحة رقم (7-9)



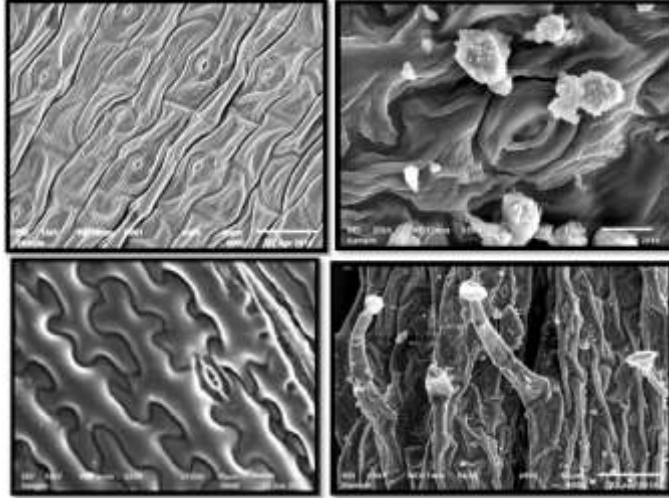
لوحة (7-9) جهاز طلاء sputtering chamber

3- تنقل الاسطوانات المعدنية إلى المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electron microscope وتفحص كما في اللوحة رقم (8-9)

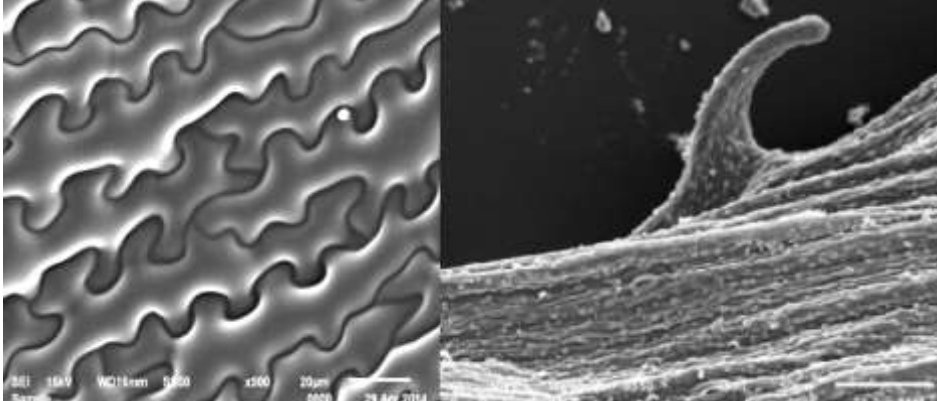


لوحة (8-9) SEM :

نتائج الفحص موضحة في اللوحات أدناه:



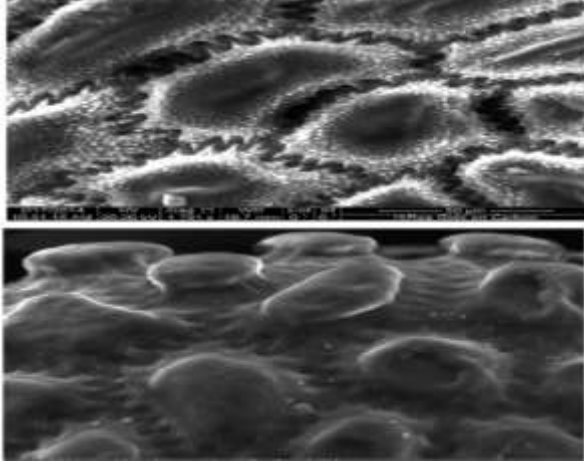
لوحة (9-9) :صور لبشرة اوراق الجنس *Minuartia* التابع للعائلة القرنفلية توضح البشرة العليا والسفلى وشكل الثغر والشعيرات المنشرة على اسطح الورقة (الطائي، 2014)



لوحة (10-9) :صور لبشرة اوراق الكأي للجنس *Minuartia* التابع للعائلة القرنفلية توضح البشرة السفلى والشعيرة الغير الغدية في البشرة (الطائي، 2014)



لوحة (9-11) : صور المظهر الخارجي لبذور بعض أنواع الجنس *Minuartia* التابع للعائلة القرنفلية (الطائي، 2014)

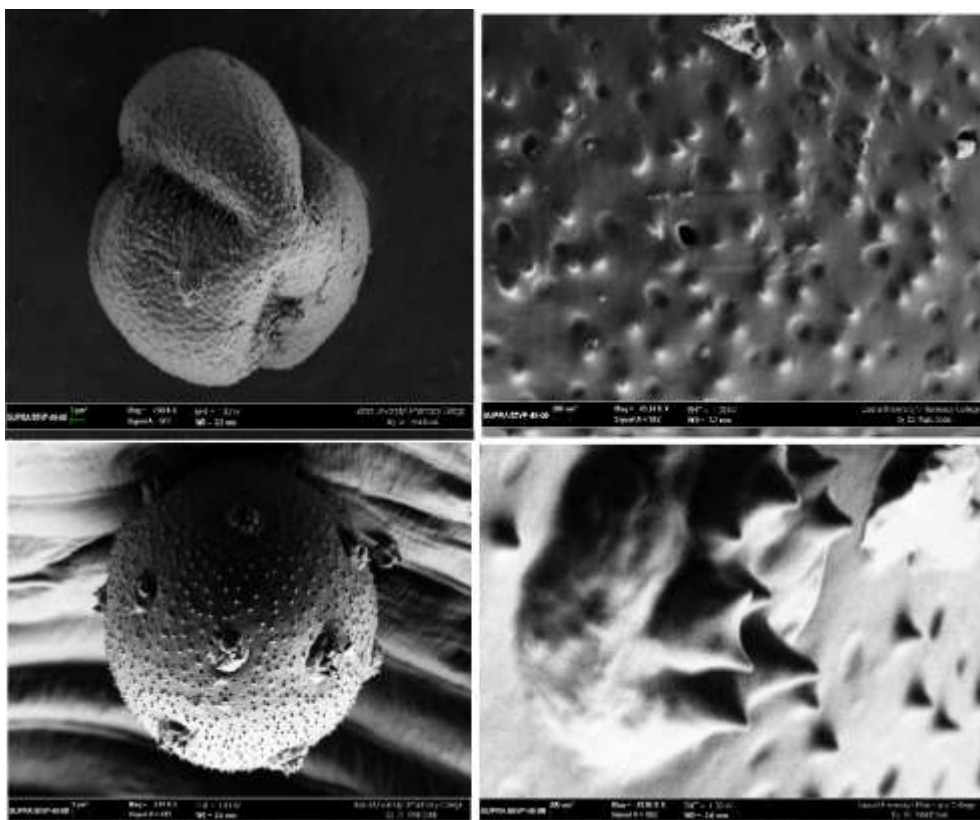


لوحة (9-12) : صور المظهر الخارجي لبذور توضع اشكال الزخارف على السطح البذرة لبعض أنواع الجنس *Minuartia* التابع للعائلة القرنفلية (الطائي، 2014)
ثانياً : فحص عينات حبوب اللقاح

يتم فحص حبوب اللقاح بالطريقة التالية :

- 1- اخذ العديد من المتوك وعوملت بطريقة التحلل الحامضي Acetolysis التي وصفها (AL-Mayah 1983) ويمكن تلخيصها بما يأتي :-
أ) أخذت المتوك من الأزهار الجافة وغليت بمحلول 10% من هيدروكسيد البوتاسيوم لمدة خمس دقائق .

- ب) هرسّت المتوك خلال منخل دقيق ووضعت في أنابيب اختبار .
- ت) غسّلت العينات بحامض الخليك الثلجي ودورت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة ثم سحب الراشح وترك الراسب.
- ث) أضيف 5 مل من محلول محضر أنيا مكون من (9 أجزاء من استيك انهيدريد acetic anhydride وجزء واحد من حامض الكبريتيك المركز). سخنت الأنابيب باستعمال حمام مائي لمدة 2 - 3 دقائق وبدرجة 100°م ودورت بجهاز الطرد المركزي ثم أزيل المحلول .
- ج) غسّلت حبوب اللقاح بالماء المقطر ثلاث مرات ودورت العينات في جهاز الطرد المركزي بعد كل مرة.
- 1- بعدها جرت عملية سحب الماء Dehydration باستخدام سلسلة تصاعدية من تراكيز الكحول الايثيلي 50% ، 70% ، 90% ، 100% ، ثم حفظت بمادة الأسيتون Acetone.
- 2- تركت حبوب اللقاح التي تجمعت في وسط الزجاجاة لتجف .
- 3- بعدها نقلت بواسطة إبرة تشريح دقيقة جدا" من الـ (Tengeston) معاملة بنترات الصوديوم إلى اسطوانة معدنية متخصصة (Metal stup) مغطاة بشريط ذي وجهين لاصقين (double sided cello tape) طليت الاسطوانات المعدنية بالذهب باستخدام جهاز طلاء sputtering chamber من نوع (Sputter coaterSC-7640) بسمك 200 انكستروم.
- 4- نقلت الاسطوانات المعدنية إلى المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electron microscope، بعدها تكون العينات جاهزة للفحص وادانة بعض صور حبوب اللقاح تحت المجهر الالكتروني الماسح



لوحة (9-13) : صور المظهر الخارجي لحبوب لقاح والزخارف على سطح الحبة لبعض أنواع الجنس *Minuartia* التابع للعائلة القرنفلية (*Altaie and Almousawi*، 2018)

المصادر

الطائي ، صادق صبيح كريم (2014) . دراسة تصنيفية لأنواع الجنس *Minuartia* (Caryophyllaceae) L. في العراق . رسالة ماجستير . كلية العلوم – جامعة البصرة .

Altaie ، S.K. and Almousawi، U. M. (2018) . Pollen Morphology of Caryophyllaceae Species From Iraq . Misan journal for academic studies . Vol .17 (33):271-285.

Al. Mayah، A. A. (1983). The taxonomy of *Terminalia* (Combretaceae) and related genera Ph. D. thesis، Univ. of Leicester

المجهر الفلوريستنت Fluorescent microscope

رفل فراس جابر

صبغة (AO\EB) Acridine orange\ Ethidium bromide المتألقة
المزدوجة :

صبغة (AO) هي صبغة كاتيونية فلورية منتقاة للحمض النووي. لها القابلية على النفاذ الى داخل الخلايا ، وتستخدم لتصبغ الخلايا الحية والميتة على حد سواء، تستخدم صبغة AO بشكل شائع في الفحص المجهرى للمجهر المتألق Fluorescent microscope وتحليل التدفق الخلوي للفيزيولوجيا الخلوية وحالة الدورة الخلوية.

تحت المجهر الفلوريستنت Fluorescent microscope: تظهر الخلايا الحية خضراء بشكل موحد. الخلايا التي تعاني من موت خلية مبرمج ستصبغ باللون الأخضر وتحتوي على نقطة متألقة في النواة نتيجة لتكثيف الكروماتين والتفتت النووي . تصبغ الخلايا الميتة باللون الاصفر والبرتقالي دلالة على ان الخلايا في المرحلة الاخيرة من موت الخلية المبرمج او تصبغ باللون الاحمر دلالة ان الخلايا الميتة تعاني من نخر خلوي Cell Necrosis. يمكن لـ EB تصبغ الخلايا التي فقدت غشائها الخلوي فقط الغشاء فقط.

تستخدم هذه الصبغة المزدوجة للقطاعات النسيجية المطمورة بشمع البرافين بسمك 4- 5 مايكرومتر ويتم فحص هذه القطاعات بعد تصبيغها بالمجهر المتألق Fluorescent microscope. يمكن ان تستخدم كل من الصبغتين على حدة وحسب الغرض من الدراسة.

المكونات (Kit components):

المكون A: محلول التصبغ لصبغة AO

المكون B: محلول التصبغ لصبغة EB

المكون C: محلول منظم (بفر) 10X

التخزين:

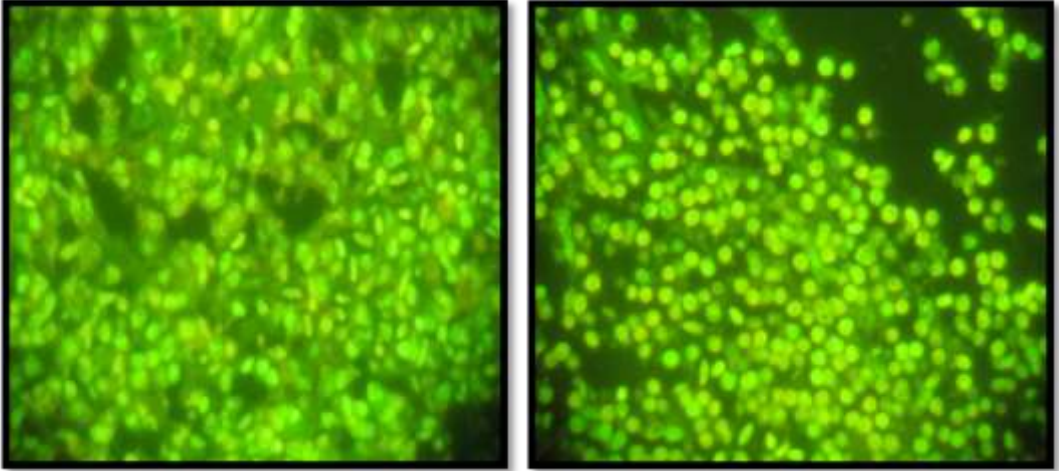
يخزن في 2- 8 درجة مئوية بمعزل عن الضوء.

طريقة العمل (لأنسجة الحيوانية):

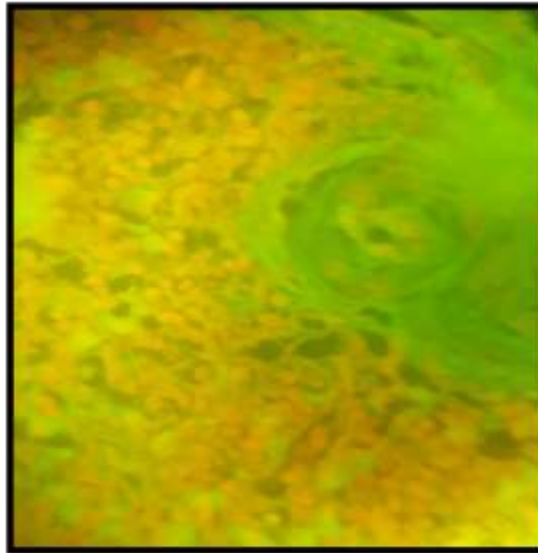
- 1 - يتم إزالة الشمع من المقاطع النسيجية بواسطة محلول زيلين ولمدة (10-15) دقيقة.
- 2- يعاد ترطيب المقاطع في كحول الإيثانول (99% ، 90% ، 70%) ثم تغسل بالماء المقطر.
- 3- تصبغ الشرائح النسيجية بالصبغة المزدوجة AO\EB ولمدة 5 دقائق.

4- تشطف الشرائح النسيجية بمحلول الفوسفات المنظم (بفر) لإزالة الصبغة الزائدة وتترك الشرائح لتجف لبضع دقائق.

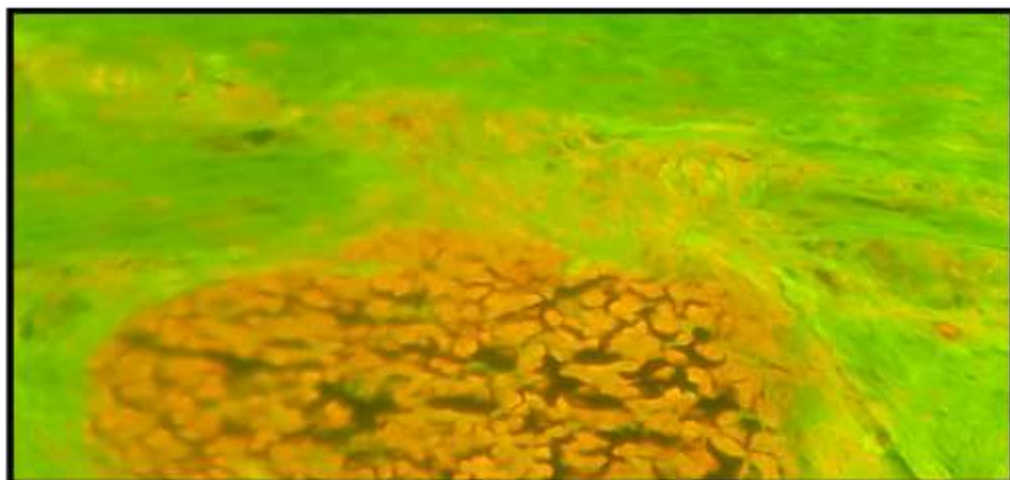
5- تغطي الشرائح بوسط تغطية مناسب DPX ثم تفحص باستخدام المجهر المتألق Fluorescent microscope.



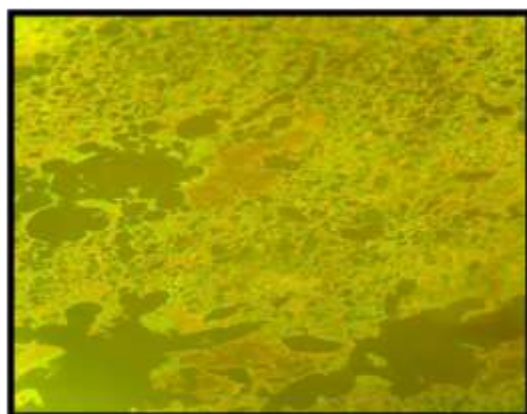
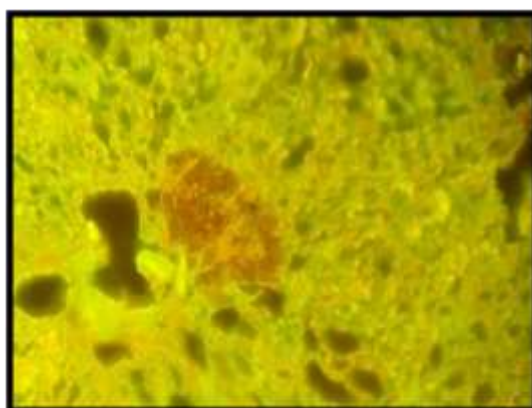
(صورة 9-14): مأخوذة بواسطة المجهر المتألق Fluorescent microscope لنسيج الطحال بقوة تكبير 40x (Rafel، 2018)



(صورة 9-15): مأخوذة بواسطة المجهر المتألق Fluorescent microscope للنسيج اللوز الاغورية في الامعاء بقوة تكبير 40x (Rafel، 2018)



(صورة 9-16): مأخوذة بواسطة المجهر المتألق Fluorescent microscope للنسيج اللوز الاغورية في الامعاء بقوة تكبير 40x (Rafel، 2018)



(صورة 9-17) مأخوذة بواسطة المجهر المتألق Fluorescent microscope للنسيج اللمفاوي في الرئة بقوة تكبير 10x، 40x (Rafel، 2018).

المصدر:

Rafel Firas Jaber (2018). Histological and Histochemical Studies for Evaluation of Carbon Accumulation in Lymphatic Tissues of Birds within Polluted Areas . MSc. Thesis. College of science-University of wassit.

Lille and Fullmer, (1976). Histopathological technique and practical histochemistry, 4th edition. Mc Grow-Hill, New York; Pp:120-121.

Curriculum Vitae

Name: Rafal Firas Jaber

Gender: Female

Date of birth: 16-09-1993

Nationality: Iraqi

Languages: Arabic, English

E-mail: Rafelfiras@gmail.com

Jaber20@graduate.utm.my

Telephone no.: 00964-7740336924

Current post: Academic Lecturer

Institution: Al-Kut university college Iraq

Address: Medical Laboratory technique department,
Al-kut university college, Kut, Iraq

Web site: <https://my.utm.my/iportal.php>

Research gate:

<https://www.researchgate.net/profile/Rafal-Firas>

Scopus:

<https://www.scopus.com/dashboard.uri?origin=se-archauthorfreelookup&zone=TopNavBar>

Qualification:

1. **BSc.:** Wasit University, College of Science, Biology department 2014-2015.
2. **MSc.:** Wasit University, College of Science, Biology department 2018.



الفصل العاشر

علم الاحياء الدقيقة

د. فوز عبد السلام خليل الصفار

علم الأحياء الدقيقة (**Microbiology**) هو أحد العلوم التي اكتشفت مؤخرًا في القرن التاسع عشر بعد صناعة العدسات البسيطة والتي مكنت الباحثين من مشاهدة الكائنات الحية الدقيقة التي يصعب رؤيتها بالعين المجردة، وتشمل الكائنات الحية الدقيقة البكتيريا والفطريات والطحالب والأوليات والفيروسات.

توجد الكائنات الحية الدقيقة في الطبيعة بكل مكان تقريبًا، في الماء والهواء والتربة، وكذلك على الجلد وفي الفم والأسنان والجهاز الهضمي للإنسان والحيوان وبشكل طبيعي Normal Flora، ويختلف عددها ونوعها بالنسبة للأوساط المختلفة إذ أن لكل ميكروب شروط وظروف خاصة يجب أن تتوفر له لينمو ويتكاثر، ويرجع ذلك لصغر حجمها ووزنها وسهولة انتشارها عن طريق الهواء أو الماء، وقد أمكن عزل الميكروبات على ارتفاع أربعة أميال في الجو وعلى عمق ثلاثة أميال داخل باطن الأرض وفي مياه البحار والينابيع الساخنة وفي ثلوج المناطق القطبية، ولكن هناك أماكن محدودة خالية أو يجب أن تكون خالية من الميكروبات كالدم في الإنسان والحيوان السليم والأنسجة السليمة لجسم الإنسان والحيوان والنبات وكذلك البراكين النائرة وطبقات الأرض العميقة والمواد القاتلة للأحياء مثل الأحماض والقلويات القوية والمواد والأجهزة المعقمة.

نظرًا لسهولة تداول البكتيريا ونموها السريع وقدرتها الكبيرة على التكيف، فقد أصبحت الأداة المفضلة في أبحاث الكيمياء الحيوية وعلم الوراثة وفي مجالات الهندسة الوراثية، وبالتالي ساهمت في حلها للعديد من المشاكل الأساسية المتعلقة بعلوم الحياة، وأصبحت البكتيريا وأنشطتها المختلفة ذات الطابع (كثير النفع قليل الضرر) تمثل اهتمامًا متزايدًا بالمجتمع سواء على المستوى المحلي أو العالمي، بسبب الأدوار التي تلعبها هذه الكائنات الدقيقة في الأوساط البيئية المختلفة كالهواء والمياه والأرض والغذاء، وفي معالجة المشاكل البيئية وإعادة تدوير المصادر الطبيعية وقدرتها على المساهمة في حل مشكلة نقص البروتين العالمي كغذاء، وإنتاج الطاقة الحيوية (غاز الميثان)، بالإضافة إلى أهميتها في الجوانب العلاجية.

شروط السلامة العامة في مختبرات الأحياء الدقيقة. Microbiology Lab. Safety

التعقيم والنظافة من أساسيات العمل البكتريولوجي لذا من الضروري تحديد بعض إجراءات السلامة العامة التي يجب اتباعها في مختبر الأحياء الدقيقة. من أجل منع انتقال العدوى للعاملين أو البيئة المحيطة لذا وجب على الطالب مراعاة الارشادات واتخاذ ما يلزم من الاحتياطات الأساسية التي يتوجب اتباعها في مختبرات البكتريولوجي وأهم هذه الإجراءات هي:

1. تجنب الأكل أو حفظ الطعام أو الشراب أو التدخين داخل المختبر.
2. لمنع تلوث الملابس، يجب عليك ارتداء الـ Lab Coat واغلاقه واستخدام القفازات المطاطية أثناء العمل.
3. اغسل يديك بالماء والصابون وعقمها بالكحول بشكل مستمر.
4. عدم لمس العينين أو الفم أو الأنف أثناء العمل .
5. قبل البدء بالعمل يجب ان يتم تعقيم مكان العمل بالكحول 70% ويفضل القيام بعملية الزراعة في غرفة الزرع Safety Cabinete.
6. المحافظة على مكان العمل نظيفاً ومعقماً وتجنب ازدحامه بالعينات والاجهزة.
7. اخذ الحذر عند التعامل مع العينات المرضية او الادوات الحادة مثل الابرنج والسررنج الواخرة .
8. يجب المحافظة على الاوعية المحتوية على العينات مغلقة بشكل جيد وعدم فتحها الا في حيز معقم او بجانب لهب، ولايجوز نقل المزارع البكتيرية خارج المختبر.
9. وضع المواد الملوثة او المزارع القديمة في اوعية خاصة تمهيد للتخلص منها واتلافها في جهاز الاتلاف Autoclave .
10. التعقيم المباشر للادوات المختبرية المستخدمة قبل وبعد كل استعمال كتعقيم الـ Loob باللهب وتعقيم الماصات بالكحول 70% او محلول هيبوكلورات الصوديوم 10%.
11. لايجوز استخدام الماصات Pipeites الفموية لنقل المزارع البكتيرية وفي حالة عدم توفر الماصات الاتوماتيكية يستحسن وضع كمية من القطن في النهاية العريضة للماصة قبل استخدامها.
12. عند حدوث تلوث للملابس او الجلد او أسطح العمل بالبكتيريا او العينات المرضية يستخدم الكحول 70% او محلول هيبوكلورات الصوديوم للتعقيم المباشر.
13. عند القيام بعملية تلقيح الوسط الغذائي في انبوبة او قنينة يجب مسكها بوضع افقي للحفاظ على الوسط من التلوث .
14. مرر فوهة الانبوبة او الزجاجاة المراد تلقيحها على اللهب بعد نزع غطائها لكي لا تنتشر في جو المختبر.

التعقيم Sterilization

هو مصطلح يطلق على عملية التخلص والقتل الكامل للأحياء المجهرية الموجودة في الوسط بحالتها السبورية والخضرية والتعقيم يكون مطلقاً، أي لا توجد له درجات. ويعتبر من اهم العمليات التي تجرى في جميع مختبرات الاحياء المجهرية وذلك لاسباب عديدة منها:

- 1- منع الاصابة بالامراض .
- 2- منع تلف الاوساط والمواد الغذائية.
- 3- منع تداخل ونمو احياء مجهرية في بعض الصناعات التي تعتمد على وجود نوع معين منها.

4- منع تلوث المواد والادوات المستعملة في المختبرات التي تتعامل مع نوع واحد نقي من الاحياء المجهرية.

التطهير: disinfection:

هو ازالة جميع أو معظم الأحياء المجهرية الممرضة، اي على عكس التعقيم، فان التطهير قد يبقى بعض الميكروبات غير الممرضة أو اعداد قليلة من الاحياء الممرضة غير كافية لاحداث المرض أو لاحداث الاصابة، المواد المطهرة عادة تكون biocides اي قاتلة للحياة ولكن تستخدم بتركيز كافية تقتل الاحياء اينما وجدت سواء على المناضد أو الارضيات وغيرها من الاسطح غير الحية عند ذلك تدعى المطهرات germicides. اما اذا استخدمت على خلايا حية مثل الجلد فتدعى antiseptic .

*Decontamination: هو تقليل أو تقليص اعداد الميكروبات الممرضة، وذلك باستخدام التغميس أو استخدام الحرارة أو المطهرات. ان عمليات الغسل والجلي باستخدام الصابون والمنظفات تحقق لنا السيطرة على الميكروبات غير المرغوبة والفيروسات، وهي من اهم العمليات اليومية لمنع انتشار الامراض.

تقسم طرق التعقيم الى قسمين رئيسيين هما:

• الطرق الفيزيائية (Physical methods): وتشمل كل من:

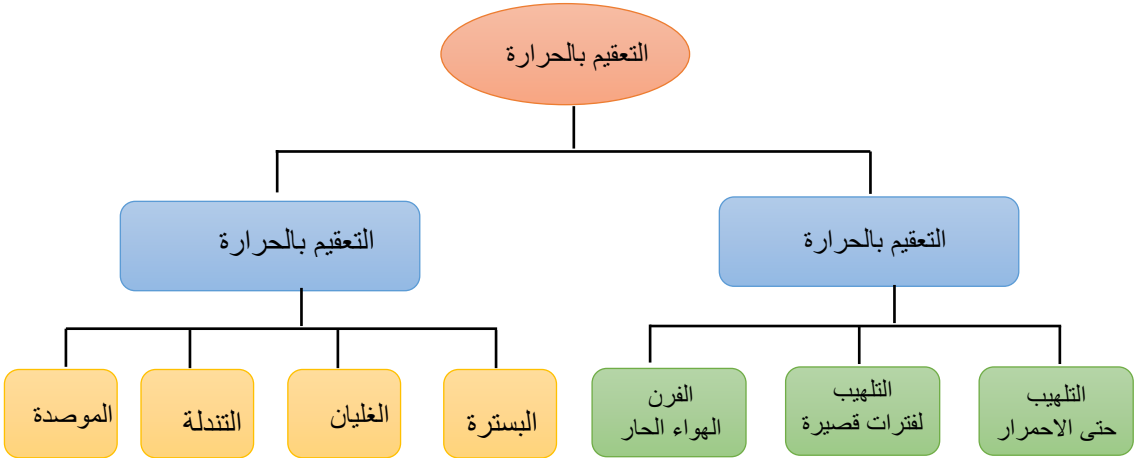
أ- الحرارة	(Heat)
أ- الترشيح	(Filtration)
ج- الاشعاع	(Radiation)

الطرق الكيميائية (Chemical methods): وتشمل كل من:

أ- الفينول	(Phenol)
أ- الكحولات	(Alcohols)
ج- الهالوجينات	(Halogens)
د- المعادن الثقيلة	(Heavy metals)
هـ- الصوابين والمنظفات	(Soap and detergents)

أولاً: الطرق الفيزيائية (physical methods):

التعقيم بالحرارة (Sterilization by Heat): يعتبر التعقيم بالحرارة من أكثر الطرق استخداماً للسيطرة على الأحياء المجهرية ويمكن توضيح أقسام التعقيم بالحرارة بالمخطط الآتي:



أ- الحرارة الجافة (dry heat):

يتم القتل بالحرارة الجافة للأسباب التالية:

مسخ البروتين & تلف تأكسدي

1. التطهير حتى الاحمرار (Flaming):

وفي هذه الطريقة تعرض المواد قيد التعقيم إلى لهب بنزن مباشرة وتستعمل مع أدوات الناقلة الجرثومية bacteriological مثل



شكل (10-1) التعرض الى لهب بنزن

loop needle، نهايات الملقط forceps والمقصات scissors والشفرة الجراحية blade حيث تمرر الأدوات السابقة الذكر خلال اللهب الى درجة الاحمرار ومن ثم تستخدم بعد تبريدها.

2 - التلھيب لفترات قصيرة (short time flaming):

تستخدم هذه الطريقة لتلھيب فتحات الانابيب والقناني المختبرية وكذلك الماصات لمنع التلوث الجرثومي عند فتحها، اذ يتم التلھيب لفترة قصيرة دون الوصول الى درجة الاحمرار.

3- فرن الهواء الحار (Hot air oven):

يستخدم فرن الهواء الحار لتعقيم المواد الزجاجية مثل أنابيب الاختبار وأطباق بتري والماصات... الخ (اذ توضع في حاظطة خاصة بالماصات) ، بالإضافة الى المواد المعدنية التي لا تتأثر بالحرارة الجافة ويستخدم لهذا الغرض فرن يعتمد على تدوير الهواء الساخن من خلال مراوح خاصة، تتراوح درجة الحرارة المستخدمة من (160 – 180 °م) ولمدة ساعة واحدة.

1-البسترة Pasteurization:

سميت نسبة الى العالم لويس باستور، وتجري البسترة بدرجة حرارة 62.9°م لمدة 30 دقيقة وتدعى بطريقة المسك holding method او بدرجة 71.6°م لمدة 15 ثانية وتدعى بطريقة الوميض flash method وتستخدم البسترة للقضاء على أغلب الجراثيم الممرضة وخصوصاً عصبيات السل وبروسيللا الإجهاض وجراثيم السالمونيلا.

2-الغليان Boiling:

ان التسخين الى درجة غليان الماء 100°م لمدة 5 – 10 دقائق كافية لقتل الجراثيم الخضرية وقسم من الجراثيم المكونة للابواغ اذ تستخدم الغلايات Boilers لهذا الغرض ومن عيوب هذه الطريقة ان هذه المواد تفقد بريقها وتعرض للتآكل والصدأ بالإضافة الى سرعة تلوثها بسهولة.

3-التعقيم بالمؤصدة Autoclaving:

يعتمد التعقيم بالمؤصدة على مبدأ استخدام الحرارة الرطبة (البخار) مع الضغط اذ توضع المواد المراد تعقيمها داخل جهاز المؤصدة autoclaving (وهو عبارة عن قدر للضغط يتم التحكم فيه بالحرارة والضغط والزمن اللازم للتعقيم) وتضبط الحرارة على درجة 121°م وضغط 15 باوند / انج2 ولمدة تتراوح بين 15 – 30 دقيقة وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم معظم أنواع الأوساط الزرعية والملابس والمواد المطاطية التي تتلف باستخدام الحرارة الجافة.

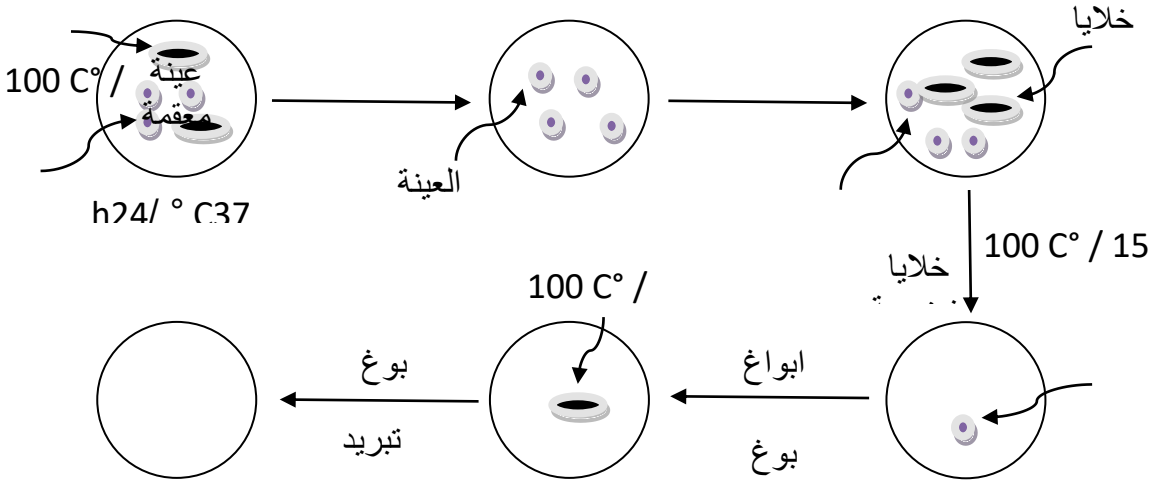


شكل (10-2) المؤسدة

معقم ارنولد : (التعقيم المنقطع) Arnold sterizier

طريقة ابتكرها Tyndall لذلك تسمى أحيانا بالتندلة Tyndallization بعد أن أدرك هذا الباحث بأن بعض البكتيريا تتواجد بشكلين هما : الخلايا الخضرية والابواغ (Spores) وان الأخيرة تتميز بمقاومتها للحرارة ، تتلخص طريقة التعقيم هذه بمعاملة المادة قيد التعقيم في 100 م° في جهاز ارنولد وبالحرارة الرطبة (بخار) ثم تبريد النموذج لمدة 24 ساعة في 37 م° وتكرار هذه العملية بعدها مرتين بالتعاقب (كما في شكل أدناه).

عبارة عن إناء يوضع فيه ماء ويدخله أرفف لوضع البيئات والمحاليل المراد تعقيمها ويلحق بالجهاز ثيرمو متر ويستعمل في تعقيم البيئات التي تفسد عند استعمال الحرارة العالية (أكثر من 100 م°) مثل البيئات التي يدخل في تركيبها الجيلاتين أو اللبن أو السكريات والتي يخشى من تحللها بالحرارة العالية ويتم التعقيم في هذا النوع من الاجهزة على ثلاث فترات في ثلاثة أيام متتالية ويسمى ايضا بالتعقيم المتقطع.



الترشيح Filtration:



تستعمل المرشحات في تعقيم الأوساط والمحاليل التي تتأثر بالحرارة مثل الأمصال المضادة ومحاليل السكريات والمضادات الحيوية إذ تعتمد على مبدأ الفصل بالترشيح اما من خلال الثقوب الصغيرة او من خلال الالتصاق على أسطح المرشحات، ان فعالية المرشحات الجرثومية تتغير مع حجم ثقبها كذلك مع الطبيعة الكيميائية للمادة ومقدار الضغط المستخدم عبر الترشيح.

شكل (3-10) مرشحة

وهناك العديد من المرشحات تختلف فيما بينها في نوع المادة التي يصنع منها المرشح وهي كما يلي :

- 1- مرشح عجينة باريس: ويكون مصنوع من الجبس .
 - 2- المرشحات الغشائية أو الجزيئية (Millipore filter) ويصنع من إسترات السيلولوز.
 - 3- مرشح شامبرلاند (مصنوع من الخزف)
 - 4- مرشح زاييتس (مصنوع من مادة الاسبستوس)
- تستخدم طريقة الترشيح في تعقيم المحاليل التي لا يمكن تعقيمها بالحرارة إذ ان الحرارة تؤثر عليها و تغير من خواصها الكيميائية و الفيزيائية.

يلاحظ ان الفيروسات يمكنها ان تمر من خلال ثقب هذه المرشحات ولذلك تستخدم في عزل الفيروسات او البكتيريوفاجات من الخلايا البكتيرية او بقايا تحليلها.

الإشعاع Radiation:

ينقسم التعقيم بالإشعاع الى نوعين أساسيين هما:

التعقيم بالأشعة المؤينة ionizing radiation:

وهي أشعة كهرومغناطيسية electromagnetic rays ذات أطوال متناهية في القصر (أقل من 10 – 40 أنكيستروم) مثل الأشعة السينية X- rays وأشعة كاما Gamma rays.

ان آلية عمل أشعة كاما غير معروفة بشكل كامل ولكن يعتقد بأنها تسبب الضرر الدائم للحمض النووي DNA بالإضافة الى تأين ماء الخلية وتكوين جذور الهيدروكسيل الحر ($HO\cdot$, $HO_2\cdot$, H_2O_2) الذي يعتبر عامل مؤكسد قوي والتي تؤثر بدورها على الحمض النووي DNA وتستخدم أشعة كاما في تعقيم المواد التي تستخدم لمرة واحدة disposable medical supplies مثل الحقن البلاستيكية plastic syringes وكذلك الكفوف الجراحية والمواد الصيدلانية التي تتأثر بالحرارة.

التعقيم بالأشعة (غير المؤينة) فوق البنفسجية U.V light:

وهي الأشعة ذات الطول الموجي (2400 – 2800 أنكيستروم).

سلبات هذه الإشعاعات:

احتمال تأثيرها على العين، وطول التعرض لها يؤدي إلى إحداث حروق بالجلد، والإصابة بسرطان الجلد. كما أن عدم قدرتها على الاختراق يحتم تعريض الميكروبات لها بطريقة مباشرة إذا أريد الحصول على نتائج فعالة من استخدامها، ذلك أن وجود أي حاجز مثل الأوراق والأقمشة... إلخ، يمنع وصولها إلى الميكروبات.

ثانياً: الطرق الكيميائية Chemical methods:

ان تأثير العوامل الكيميائية chemical agents اما ان يكون قاتلاً للجراثيم bactericidal حيث يؤدي الى قتل الجراثيم أو ان يكون مثبطاً لنموها bacteriostatic اذ يعمل فقط على إيقاف نمو الجراثيم ومنع تكاثرها، ان تركيز المطهر والفترة الزمنية التي تتعرض فيها الجراثيم للمعقم ودرجة الحرارة وكمية التلوث كلها عوامل لها تأثير مباشر على كفاءة عمل العوامل الكيميائية ويمكن تقسيم أهم العوامل الكيميائية الى المجاميع التالية:

الفينول Phenol:

ان الفينول النقي لا يستعمل حالياً وذلك بسبب تأثيره المخدش ورائحته الغير مقبولة إلا انه الأساس لتطوير العديد من المطهرات التي تدعى بالمطهرات الفينولية والتي تضم الكريسولات cresols والديتول Dettol اذ ان الفينولات تعمل على الاغشية

السايتوبلازمية للجراثيم وتسبب تسرب محتويات الخلية في التراكيز الواطئة وتسبب تخثر البروتين في التراكيز العالية.

الكحولات Alcohols:

يعتبر الكحول الايثيلي والكحول الايزوبروبيلي ذا فعالية سريعة في قتل الجراثيم الخضرية والفطريات وان طبيعة عمل الكحولات هي تغيير طبيعة البروتين داخل الخلية الجرثومية كما يعمل مذيئاً جيداً للمواد الدهنية في الغشاء الخلوي اذ ان استخدام تركيز 70% من الكحولات هو أكثر فعالية من التراكيز النقية 99،9% وذلك يعود الى ان إضافة الماء الى الكحول يزيد من فعاليته ويمكن جعل الكحول قاتلاً للابواغ بإضافة 1% من حامض الكبريتيك او هيدروكسيد الصوديوم الى محلول الكحول 70%.

الهالوجينات Halogens:

تضم الهالوجينات عدة عناصر ولكن الكلور واليود فقط هي التي لها تأثير مطهر وتعتبر عناصر مؤكسدة ويستخدم الهايبوكلورات hypochlorite في صناعة المواد القاصرة bleaching agents المستخدمة في تعقيم أدوات صناعة الألبان وحمامات السباحة ويستخدم اليود كصبغة بتركيز 1% ومن مساوئ اليود هي الحساسية واصطباغ الجلد وقد تم التغلب على هذه المشاكل من خلال إضافة بعض المواد المنظفة والتي تدعى بحاملات اليود، ان آلية عمل الهالوجينات تتمثل بأكسدة البروتينات الخلية الجرثومية وبالتالي موتها.

المعادن الثقيلة Heavy metals:

ان معظم المعادن الثقيلة تحتوي على الزئبق والفضة وتشمل المركبات العضوية وغير العضوية لهذه المعادن والمثال الشائع هو المركب التجاري الميركروكروم mercurochrome المستخدم في تطهير الجروح وتستخدم مركبات الزئبق في الوقت الحاضر كمواد حافظة تبيد الجراثيم وتمنع نمو الفطريات. ان آلية عمل المعادن الثقيلة هي تثبيط الخمائر اذ يعمل الزئبق مثلاً على الارتباط عكسياً بمجاميع السلفادريل SH في البروتينات الجرثومية مما يؤدي الى تثبيط عمل هذه البروتينات وموت الخلية الجرثومية.

أشكال البكتيريا ونظام تجمعها Cell shape and Aggregation

الشكل المورفولوجي للبكتيريا Morphology of the bacterial cell

يتضمن دراسة الشكل المظهري للخلية البكتيرية (الشكل المورفولوجي) معرفة شكلها وحجمها وطريقة تجمعها وحركتها وعموماً فإن الخلية لا تختلف كثيراً من ناحية التركيب الخلوي عن خلايا الكائنات الأخرى وحيدة الخلية ، ولكن نظراً لصغر حجمها المتناهي فنتم دراستها بالفحص الميكروسكوبي بعد معاملتها معاملة خاصة وذلك باستعمال الأصباغ البسيطة أو المركبة (الصبغات التفريقية) وذلك للتعرف علي أجزاء الخلية المختلفة أو تتم دراستها في تحضيرات جافة غير مصبوعة عند استعمال

الميكروسكوب الإلكتروني للتعرف علي الأجزاء والمكونات الدقيقة التي يصعب التعرف عليها بالمجهر العادي .

تنحصر أشكال البكتيريا المختلفة في الأقسام التالية

أولاً : الشكل الكروي Spherical: واسمه العلمي *Cocci* (ومفردها *coccus*) والبكتيريا الكروية قد تكون مستديرة تماماً كما في جنس *Micrococcus* أو ليست مستديرة تماماً فتأخذ الشكل البيضي *Oval* أو الشكل الكلوى *Kidney shape* أو الشكل الأهليجي *Ellipsoidal* وعادة ما يكون طول الخلية الكروية مساو لعرضها .

وتتميز البكتيريا الكروية عن بعضها حسب قابليتها للصبغ بطريقة كرام فمنها الموجب لكرام أو السالب ، وتبعاً لحركتها فمنها المتحرك وغير المتحرك ، وبعضها ينمو تحت ظروف هوائية أو اختيارية والبعض تحت ظروف لاهوائية كما تتميز عن بعضهما أيضاً حسب نظام تجمعها نتيجة لطريقة انقسامها



شكل (10-4) اشكال الخلايا

1- إذا انقسمت الخلية الكروية مكونة خليتين ملتصقتين ببعضهما يقال أنها خلايا زوجية *Diplococcus* وتكون الخلايا مفلطحة عند أماكن الاتصال *Flattened* أو منحنية فتظهر الخلايا بشكل الكلية *Kidney* ومن أمثلة الميكروبات الكروية التي تتواجد غالباً في أزواج : **Deplococcus**



- أزواج سالبة لكرام ممرضة للإنسان مثل *Neisseria meningitidis* يسبب الالتهاب السحائي للمخ ، أما جنس *Azotobacter* يتميز خلاياه بأنها كروية أو بيضاوية في أزواج سالبة لكرام وتثبت أزوت الهواء الجوى تحت ظروف هوائية

- أزواج موجبة لكرام هوائية أو هوائية اختيارية مثل *Leuconostoc*

2- إذا استمر الكائن البكتيري في الانقسام في نفس المستوي وكانت الحواجز العرضية المتكونة متوازنة فإن التجمع الناتج علي هيئة سلسلة *Chain* أو سبجي ويسمي *Streptococcus* وطول السلسلة المتكونة يعتبر من الصفات

- 3- الممیزة للأنواع المختلفة فقد يكون التجمع في سلاسل قصيرة أو سلاسل طويلة. ومن أمثلة الميكروبات
- 4- الكروية التي توجد في سلاسل قصيرة ميكروب *Streptococcus lactis* المسبب لحموضة اللبن

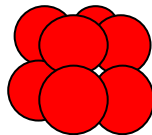
Streptococcus



3- وعندما تنقسم الخلية الكروية في مستوى واحد مكونة خليتين ينقسمان بدورهما في مستوى عمودي على الأول فانه تتكون مجموعة من أربع خلايا ويسمى هذا التجمع رباعي *Tetracoccus* مثل جنس *Pediococcus* الذي يكون كبسولة تسبب اللزوجة Ropy and Viscous في بعض المشروبات .

4- وإذا حدث الانقسام في ثلاثة اتجاهات متعامدة فانه ينتج من ذلك تجمع خلايا في شكل رزمة مكعبة *Cubic packets* ويسمى هذا التجمع *Sarcina* أمثلتها: أفراد جنس الـ *Sarcina* وتتواجد في التربة ومنها أنواع ممرضة للإنسان حيث تصيب الأمعاء أما ميكروب *Sporosarcina urea* من الكرويات المتجرثمة ويحلل اليوريا . :

Cubic packets



2- وإذا حدث الانقسام في مستويات مختلفة فانه يتكون مجموعة تشبة عنقود العنب وهذا التجمع يعرفا باسم *Clusters* أو عنقودي ومن أمثلتها *Staphylococcus aureus* المسبب للدمامل والتسممات وهو من الميكروبات الموجبة لجرام .

Staphylocoques



ثانيا : الشكل العصوى -Rod:

shaped وأسمه العلمي *Bacilli* (ومفردها *Bacillus*) لها طول وعرض لذلك فهي تقسم الى عصوى قصير *Short Rods* طولها يقرب من عرضها مثل أجناس *Salmonella* و *Shigella* وكلاهما ممرض للإنسان و جنس *Erwinia* الممرض للنبات، أو عصوى طويل *Long rod* اذ يبلغ الطول من 3 الى 10 أمثال العرض مثل أجناس *Bacillus* ، *Clostridium* وطرف البكتيريا العصوية قد يكون مستوى *Square cut* أو مستدير *Rounded* . أما من حيث استقامة البكتيريا العصوية فقد تكون مستقيمة وقد تكون مقوسة أو تصل الى الانحناء . والبكتيريا العصوية منها

المتجرثم ومنها غير المتجرثم . وتتميز البكتيريا العصوية على أساس تفاعلها مع صبغة كرام فمنها الموجب ومنها السالب .

البكتيريا العصوية قد تكون مفردة أو تنقسم في مستوى واحد فقط مكونة سلسلة من الخلايا قد تبقى متصلة في سلسلة أو في أزواج . وقد تتجمع في أشكال مختلفة كما موضح بالأمثلة التالية:

1- العصويات المفردة منها السالب لصبغة كرام مثل *Escherichia* والموجبة لصبغة كرام مثل *Methanobacterium*



2- العصويات الزوجية
Deplobacillus

شكل (5-10) بكتيريا عصوية

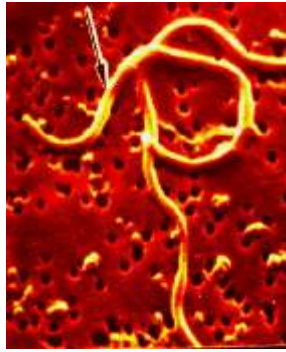
3- عصويات تتواجد في سلاسل : متجرثمة مثل *Bacillus* ،
Clostridium، *Sporolactobacillus* ، *Lactobacillus* ،
وأخرى غير متجرثمة مثل

4- عصويات تأخذ أشكال متعددة *Pleomorphic rods* فنجد الخلايا القصيرة والطويلة والمفردة والتي في أزواج وتجمعات مختلفة مثل أجناس *Proteus* ، *Bacteroids* أو قد تأخذ الخلايا العصوية أشكالاً غير منتظمة نتيجة التصاق الخلايا بزوايا حادة مع بعض انقسامات مكونة شكل الحروف الصينية *Chinese letters* ويطلق علي هذا الإنقسام *Snapping* مثل بكتيريا *Corynebacterium* المسبب لمرض الدفتريا في الانسان .

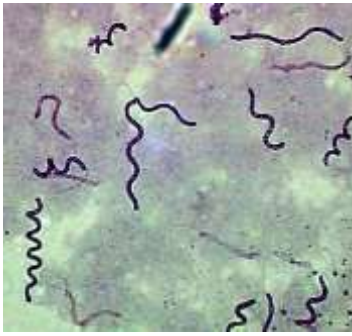
ثالثاً : الشكل الحلزوني **Spiral** : وأسمه العلمي *Spirillum* وجمعها *Spirilla* وتنقسم البكتيريا الحلزونية إلي :



- عصويات منحنية *Curved rods* :
تأخذ أقل من لفة كاملة فتظهر بشكل واوي
Vibriod، *Comma Shaped* ومن أمثلتها
ميكروب *Vibrio cholera* المسبب لمرض
الكوليرا والبكتيريا المختزلة للكبريتات التابعة
للجنس *Desulfovibrio* وميكروب
Campylobacter jejuni المسبب
للإسهال.



- عصويات ملتفة فتأخذ الشكل الحلزوني *Spirillum* ولكنها لا تلتف حول خيوط محورية مركزية . وهى ذات جدار صلب Rigid cell wall ولذلك فان الخلايا غير مرنة وهى مفردة وسالبة لصبغة جرام وتتحرك بالأسواط مثل الأنواع التابعة لجنس *Azospirillum*.

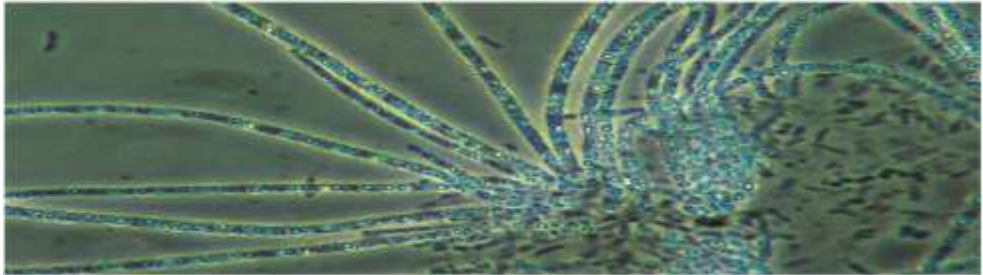


- البكتيريا الحلزونية التابعة لمجموعة الـ *Spirochetes* هي عصويات ملتفة حلزونية حول واحد أو أكثر من الخيوط المحورية المركزية Central axial fibrils ، ويختلف طول الخلية باختلاف الأنواع فتتراوح بين 3- 500 um والبكتيريا ذات جدار مرن والحركة بدون فلاجلات ومن أمثلتها *Treponema pallidum* المسبب لمرض الزهري للإنسان .

شكل (6-10) البكتيريا الحلزونية

• رابعا : الشكل الخيطي :

البكتيريا الخيطية تشتمل على مجموعة من البكتيريا تشبه فى أشكالها الكائنات الحية الأرقى مثل الفطريات والطحالب، مثالها كما في جنس *Leptothrix*



شكل (7-10) البكتيريا الخيطية

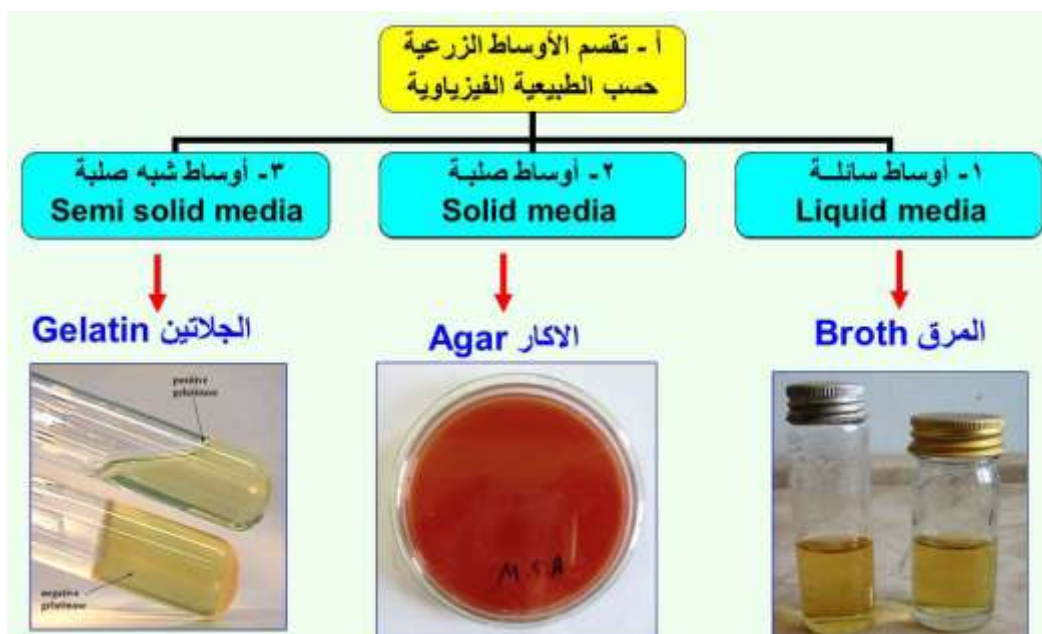
الأوساط الزرعية Culture Media

الوسط الزراعي : هو خليط متوازن من المواد الغذائية التي تحتاجها الاحياء المجهرية.

تتطلب تنمية الاحياء المجهرية بشكل عام توفر الماء ومصدر للطاقة ومصادر من الكربون والنتروجين والعناصر المعدنية فضلا عن توفير بعض الفيتامينات أحيانا.

الهدف من استعمال الأوساط الزرعية:

- 1-تنمية الاحياء المجهرية مختبريا
 - 2-دراسة خصائص الاحياء النامية عليها لغرض التشخيص
 - 3-عزل وتنقية الاحياء المجهرية لغرض دراستها
 - 4-تقدير اعداد الاحياء المجهرية في عينة (غذاء، ماء، تربة....الخ)
 - 5-حفظ وادامة الاحياء المجهرية مختبريا ولفترات طويلة.
- أ -تقسيم الاوساط الزرعية حسب قوامها:

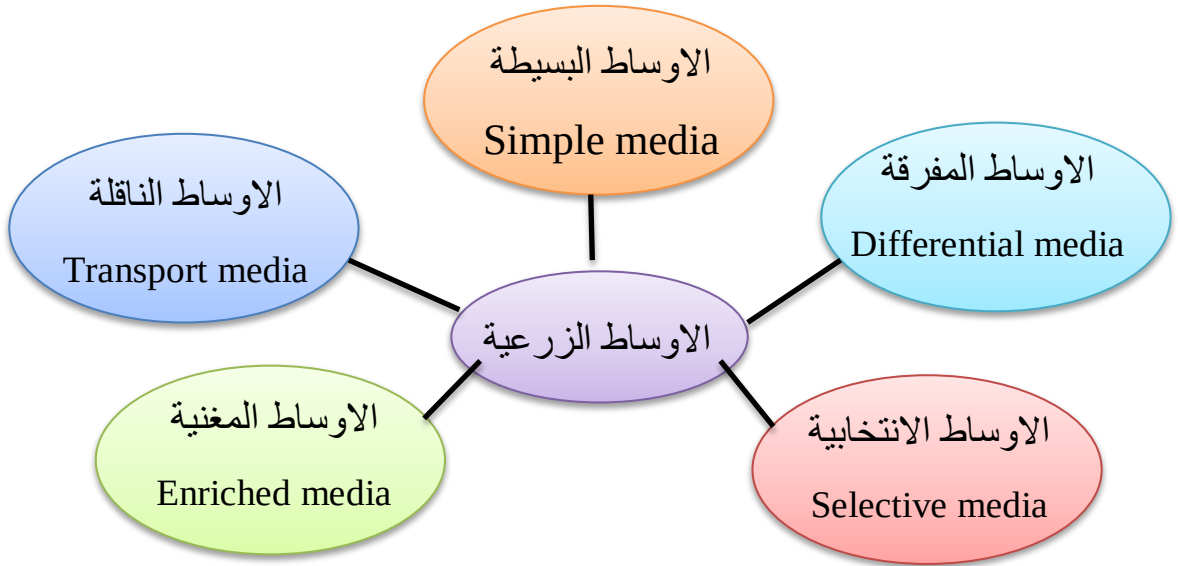


شكل (8-10) أنواع الأوساط

- 1- الأوساط السائلة **Liquid media**: هي الأوساط التي لا تحتوي على مواد تصليب مثل الأكار والجلاتين. والشركات المنتجة لهذه الأوساط تضع كلمة **Broth** عليها.

- 2- الأوساط شبه الصلبة **Semi-Solid media**: هي الأوساط التي يضاف لها مواد تصليب بنسب قليلة 1%.
- 3- الأوساط الصلبة **Solid media**: هي الأوساط التي يضاف لها مواد تصليب بنسبة (1.5-2 %) مما يسمح بتصليبها عند درجة حرارة بين (40-45%) م°.

ب - تقسيم الأوساط الزرعية حسب الغاية من استعمالها:



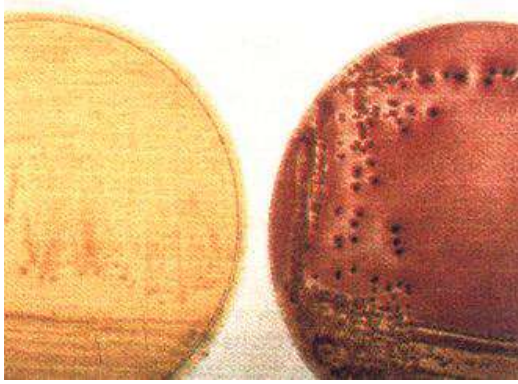
1- الأوساط البسيطة **Simple media**: تحتوي هذه الأوساط على المواد الغذائية الأساسية كمصدر للنيتروجين والكربون وتنمو فيها معظم الجراثيم التي لا تحتاج إلى مواد غذائية نادرة أو معقدة، ومن أمثلتها:

المرق المغذي Nutrient broth

ماء الببتون Peptone water

الأكار المغذي Nutrient agar

2- الأوساط التفريقية **Differential media**: تحتوي هذه الأوساط على مواد تجعل بعض البكتيريا تظهر بشكل يختلف عن الأنواع الأخرى وتسمح بالتفريق بين نوع وآخر مثال ذلك وسط ماکونکی MacConkey هذا الوسط يحتوي على سكر اللاكتوز و دليل الأحمر المتعادل neutral red بعد نمو البكتيريا المعوية على هذا الوسط قسم منها يخمر سكر اللاكتوز مثل *Escherichia coli* لتنتج حامض يغير لون الدليل بحيث تبدو المستعمرات بلون وردي غامق مثل بكتيريا *proteus mirabilis* تظهر مستعمراتها شاحبة اللون لاحظ الشكل.



شكل (9-10) وسط ماكونكي لجهة اليمين المخمر للاكتوز في *Escherichia coli* ولجهة اليسار غير مخمر للاكتوز في (*proteus mirabilis*)

او وسط أكار الدم Blood agar يعمل على التفريق بين الجراثيم المحللة للدم عن تلك غير المحللة للدم، ويتكون أكار الدم من الوسط الاساس blood agar base، ملح الطعام، ببتون ثم يضاف له الدم المعقم بتركيز نهائي 5-10%. اذ تتم اضافة الدم بدرجة حرارة 50م°.

3- الأوساط الانتخائية Selective media :

تحتوي هذه الاوساط على مواد مثبطة للجراثيم غير المرغوب فيها وفي نفس الوقت تعزز من نمو الجراثيم المراد عزلها، من امثلة ذلك:

- وسط بزموت سلفايت Bismuth Sulphite agar يستعمل هذا الوسط لعزل جراثيم السالمونيلا *Salmonella*، اهم مكوناته Brillinnt green الذي يعمل كمثبط لنمو الجراثيم اضافة لاحتواء الوسط على كاشف Bismuth Sulphite indicator .

- وسط سكر المانيتول والملح Mannitol Salt agar يستعمل هذا الوسط لعزل جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococci* حيث يتم تثبيط الجراثيم الأخرى باحتوائه على التركيز المرتفع من ملح الطعام NaCl كما يحتوي الوسط على سكر المانيتول الذي يعمل على التفريق بين جراثيم المكورات العنقودية المخمرة للسكر والتي تظهر بلون أصفر عن غير المخمرة للسكر والتي تظهر بلون أحمر Reddish.

- وسط الـ Salmonella Shiglla agar يستعمل لتنمية جراثيم العصيات المعوية من جنس السالمونيلا والشايكلا ويحتوي على املاح الصفراء والاخضر اللماع الذي يعمل على تثبيط الجراثيم الأخرى غير المرغوب فيها كما يحتوي على الثيوسلفيت لتوليد غاز كبريتيد الهيدروجين اذ تظهر المستعمرات المنتجة للغاز بلون اسود.

4- الأوساط الغنية Enriched media :

تنمو معظم أنواع الجراثيم على الأوساط البسيطة ولكن في بعض الأحيان هناك أنواع من الجراثيم قد تحتاج الى مواد مغذية و يمكن اغناء الأوساط البسيطة بإضافة مواد

غنية بالمواد العضوية والفيتامينات والخمائر والاملاح ومن الأمثلة على الأوساط المغذية:

- أ- أكار الدم Blood agar
- ب- أكار الشوكلاته Heated Blood agar (Chocolate agar)
- ج- أكار نقيع المخ والقلب Brain heart infusion agar
- د- خلاصات الانسجة الحيوانية او سوائل الجسم Tissue and body fluid's extract
- هـ- أكار المصل Serum agar
- 5- الأوساط الناقلة Transport media:

ان هذه الأوساط تكون عادة بسيطة التركيب وفي الغالب تكون سائلة اذ تستعمل لنقل العينات من مناطق بعيدة وذلك للحفاظ عليها من الجفاف لحين وصول العينة الى المختبر ومثال عليها وسط Stuart Transport medium

المكونات الأساسية للأوساط الزرعية:

تتشترك معظم الأوساط الزرعية في احتوائها على المواد التالية:

1- الببتون Peptone:

يعتبر مصدراً هاماً للنتروجين العضوي في البيئات المعدة لتنمية البكتيريا غير ذاتية التغذية ويحضر من اللحم الخالي من الدهون بعد تحلله بإنزيم الببسين.

2- الاكار المغذي Nutrient agar:

يحتوي على خلاصة اللحم، خلاصة الخميرة، ببتون، ملح الطعام، أكار أكار، وهو من الأوساط البسيطة.

3- خلاصة اللحم Beef extract:

تحضر من اللحم البقري الخالي من الدهون بعد غليه وترشيح الخلاصة وتركيزها حيث يحتوي المستخلص على بعض الأحماض غير العضوية وبعض المواد العضوية مثل الأحماض الأمينية، الكلوكوز، اليوريا، حامض اللكتيك، الفيتامينات، عوامل النمو الأخرى.

4- خلاصة الخمير Yeast extract:

تحتوي على بعض الأحماض الأمينية وبعض العوامل المساعدة للنمو وأملاح معدنية.

5- الماء Water:

تحتاج الخلايا الحية إلى الماء لنموها ولإتمام عملياتها الأيضية وذلك علاوة على استخدامه كمادة مذيبة للمواد الغذائية ويفضل استخدام الماء المقطر لخلوه من الأملاح المعدنية.

6- المواد التصليبية Solidifying agents:

تضاف إلى بيئة الزرع السائلة بعض المواد التي تعمل على تحويلها إلى بيئة صلبة تساعد على تكوين مستعمرات فرديه مثل:

الجيلاتين Gelatin:

أول ما استعمل كمادة تصليبية في بيئات الزرع وهو عبارة عن مادة بروتينية تحضر بمعاملة عظام الحيوانات ويندر حالياً استعمال الجيلاتين كمادة تصليبية في البيئة نظراً لأن كثير من البكتيريا يمكن تحليلها مائياً ولأنه ينصهر عند درجات التحضين.

الآجار آجار Agar agar:

مادة كربوهيدراتية تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء والتي تنمو بوفرة على سواحل بعض الدول مثل اليابان وهو يتصلب عند درجة حرارة من (42- 45م) ويمكن إسالته مرة ثانية عند درجة حرارة (98م) ويتميز عن الجيلاتين بكونه لا يمكن تحليله بيولوجياً لأن عدد الكائنات المحللة له قليلة جداً.

السليكا Silica:

لا تعتبر مادة غذائية فهي عادة تستعمل في تحضير البيئات اللازمة لتنمية الكائنات الذاتية التغذية وذلك لمنع نمو البكتيريا غير ذاتية التغذية معها.

طريقة تحضير الوسط الزرعي:

- 1- وزن الوسط الزرعي.
- 2- اذابة الوسط باستخدام الحرارة مع التحريك.
- 3- التعقيم بالمؤسسة Autoclave.
- 4- تيريد الوسط بعد تعقيمه.
- 5- تلهيب فوهة flask قبل الصب.
- 6- صب الوسط في طبق بتري.
- 7- تلهيب الوسط بعد الصب.
- 8- تلهيب غطاء بتري بعد الصب.
- 9- ترك الاكار يتصلب.
- 10- وضع الاطباق في أكياس لحين الاستعمال.
- 11- الحفظ في الثلاجة بشكل مقلوب.

تنمية الجراثيم على الأوساط الزرعية Bacterial growth on synthetic media:

- أ- **تنمية الجراثيم في المزارع السائلة:**
ان أسهل طريقة للتعامل مع الجراثيم تتم في تنميتها في أنابيب اختبار تحوي على أوساط زرعية سائلة كوسط المرق المغذي ووسط نقيع المخ والقلب ، يظهر النمو في المرق المغذي على النحو التالي:
- 1- **عكارة turbidity:** تتفاوت في كثافتها حسب نوع الجرثومة وكمية الحقنة كما في جراثيم القولونية *E.coli*.
 - 2- **تكوين تجمع سطحي pellicle formation:** وهذه تمثل طبقة رقيقة من الخلايا (قشرة) تطفو على سطح المرق، كما في جراثيم العصيات *Bacillus*.
 - 3- **تكوين راسب sediment formation:** يظهر النمو على شكل راسب من الخلايا يستقر في قعر الأنبوب ولكنه يرتفع بشكل لولبي أو حلزوني عند رج الأنبوبة بهدوء، كما في جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus*.
 - 4- **تكوين مخاط Slime formation:** اذا لم ترتفع الخلايا المترسبة في القعر فيعني ان راسب الخلايا النامية مخاطية، كما في جراثيم *Klebsiella*.
 - 5- **تكوين الغاز gas formation:** يمكن التأكد من وجوده بمشاهدة فقاعات الغاز التي سوف تنتج عند مزج الأنبوب كما في الجراثيم القولونية *E.coli*.
 - 6- **الخضاب الخارجي depigmentation:** حيث يلاحظ تغير لون الوسط الزراعي كما في جراثيم الزوائف *Pseudomonas*.
- ب- **تنمية الجراثيم في المزارع الصلبة:**

ان من فوائد استخدام المزارع الصلبة هو عزل الجراثيم عن بعضها لتكوين مستعمرات نقية منفردة single pure colonies وبالتالي يسهل التعامل معها وتشخيصها بسهولة والمستعمرة الواحدة تمثل النمو الناتج من انقسام خلية جرثومية واحدة.

الطرق المستعملة في تنمية الجراثيم على الاوساط الصلبة:

- 1- طريقة تخطيط الطبق Streak – plate method
- 2- طريقة الصب في الطبق Pour – plate method
- 3- النشر في الطبق spreading – plate method
- 4- الأكار المائل Agar – slop method

1- طريقة تخطيط الطبق Streak – plate method:

يتم بهذه الطريقة وضع النقلة الجرثومية على سطح الاكار قرب حافة الطبق ومن ثم تخطط بإتباع احدى الطرق الموضحة في الاشكال التخطيطية لاحقاً حيث يتم النقل والتخطيط باستخدام الناقل المعقمة sterile loop وان الخلايا المتكدسة مع بعضها في

بداية التخطيط قد تؤدي الى تكوين مستعمرات متصلة مع بعضها ولكن مع استمرار التخطيط لا يبقى الا عدد قليل من الخلايا الجرثومية على الناقله حيث يؤدي ذلك الى تكوين مستعمرات منفردة في نهاية التخطيط (وتظهر نتيجة التخطيط بعد حضانه الطبق ونمو الجراثيم) ومن الطرق الشائعة في التخطيط:

- 1- التخطيط المستمر Continuous Streaking
- 2- التخطيط المتقطع Interrupted Streaking
- 3- التخطيط المتقاطع Cross Streaking
- 4- التخطيط الشعاعي Radiant Streaking

يتم تلهيب الناقله كلما تم تغيير اتجاه الخطوط في الطريقة (2، 3، 4) كي يقل عدد الخلايا ويتم الحصول على مستعمرات منفردة.

ملاحظة: توضع الاطباق في الحاضنة بصورة مقلوبة أي الغطاء الى الأسفل، وذلك لان وضع الطبق بصورة اعتيادية (أي الغطاء الى الأعلى) وبوجود التراكيز العالية من الماء في الوسط الزراعي الصلب سوف يؤدي الى تبخر الماء وتكدسه على السطح العلوي للطبق، ولذلك فإن أي تحريك للطبق سيؤدي الى انسياب قطرات الماء على سطح الاكار ودمج المستعمرات الجرثومية مع بعضها.

2- طريقة الصب في الطبق Pour – plate method :

تستعمل هذه الطريقة للأغراض التالية:

- أ- دراسة نمط التحلل الدموي لمستعمرات الجراثيم المحللة للدم مثل *Streptococci*.
- ب- فصل المستعمرات الواحدة عن الأخرى بصورة أفضل مع نقاوة المستعمرة.
- ج- تعداد الجراثيم الحية.

وفي هذه الطريقة يتم حقن الجراثيم اثناء فترة سيولة الاكار في درجة 45° م ومن ثم يصب في الطبق وبذلك تنتشر الجراثيم في كل الوسط وليس فقط على السطح مكونة مستعمرات منفردة في الاطباق.

3- طريقة النشر في الطبق spreading – plate method :

توضع كمية 0,1 مل من معلق الجراثيم المخفف على سطح الاكار قرب المركز ثم تنتشر بواسطة ناشرة زجاجية معقمة بشكل حرف L او بواسطة ماسحة قطنية cotton swap.

4- طريقة الأكار المائل Agar – slop method :

تفضل هذه الطريقة لحفظ الجراثيم كما تستعمل لمشاهدة تكوين الخضاب او انتاج الغازات ويتم تحضير الاكار المائل بوضع أنبوب الاختبار الحاوي على وسط الاكار المغذي بصورة مائلة مرتفع الفوهة عن سطح الطاولة bench بما يقارب 30° او أقل اذا اريد الحصول على سطح مائل slant فقط اما اذا اريد الحصول على سطح مائل

بالإضافة الى قعر slant – butt لزراعة الجراثيم بواسطة الطعن stabbing فيتم وضع الانبوب الحاوي على الاكار المغذي بزاوية اكبر من 30°.

طريقة حقن الجراثيم على الأوساط الزرعية:

ان تنمية الجراثيم على الأوساط الزرعية الصلبة او السائلة تتم باتخاذ الاحتياطات والتدابير اللازمة للحفاظ على النقاوة وعدم التلوث وكما يلي:

- 1- تعقيم منطقة العمل باستخدام الكحول 70% وبحركة دائرية من المركز الى الخارج ومن ثم تلهيب السطح لفترات قصيرة.
- 2- يجب تلهيب الابرة الناقلة او الحلقة الناقلة حتى الاحمرار وبهذا سوف يتم تحطيم كافة الجراثيم الملوثة ويجب الانتباه الى تسخين الجزء السفلي من المقبض ايضاً لكي لا تدخل جراثيم ملوثة الى قناني الاختبار.
- 3- اثناء النقل يجب مسك الناقلة باليد اليمنى وكما يممسك القلم مع مسك الانبوبة باليد اليسرى ترفع السداة القطنية او الغطاء بين أصابع اليد اليمنى او الاصبع الصغير وراحة الكف مع مراعاة عدم وضع الغطاء او السداة على الطاولة، كذلك يجب مسك الانبوبة بصورة مائلة مع الأفق مع مراعاة عدم انسكاب الوسط الزراعي السائل، يجب ان يتم الحقن قرب اللهب لان تيارات الحمل من اللهب سوف تمنع دخول الجراثيم الملوثة الى داخل الانبوب.
- 4- ضرورة تعقيم فوهات القناني والأنابيب المنقول منها واليها وذلك بتلبيها لفترة قصيرة قبل حقنها بالجراثيم .

النمو على الوسط شبه الصلب (مادة الجيلاتين المطعون) Growth in semi- slid medium:

ان بعض الجراثيم تتصف بقابليتها على تمييع الجلاتين liquefaction of gelatin وتظهر هذه الصفة بعد حضانة قد تطول الى اسبوع او اكثر لذلك يجب وضع مواد مغذية وذلك لتعزيز نمو الجراثيم بالإضافة الى الجلاتين ويستفاد من التنمية على وسط الجلاتين أيضاً لمعرفة حركة الجراثيم حيث يمكن معرفة فيما اذا كانت الجراثيم متحركة ام لا من خلال طعن الوسط باستخدام ابرة خاصة لذلك ويتم قراءة نتيجة نمو الجراثيم في وسط الجلاتين من خلال امالة الوسط بعد تبريده (بعد انتهاء فترة الحضانة) حيث ان الجزء المتميع يتحول الى سائل حتى بعد التبريد في حين يكون الجزء الغير متميع صلباً في درجة حرارة التبريد.

الصبغات الميكروبية Microbial Stains:

البكتريا كائن دقيق ، عديمة اللون شبه شفافة ، ولذلك فإنه من الصعب رؤيتها في التحضيرات غير المصبوغة ، لذلك فإن صبغ البكتيريا يعتبر من العمليات الضرورية حتى يمكن تمييزها عن الوسط الموجودة به ، وحتى يتسنى دراسة الشكل الظاهري والتركيبات الخارجية والداخلية المختلفة للخلايا مما يساعد على التعرف عليها وعلى تمييزها.

الصبغة Stain or Dey :

هى مادة ملونة عضوية لها القدرة على الالتحام مع المواد الأخرى معطية لها اللون. ويجب أن يتوافر لها شرطان أساسيان هما:

1. توافر ما يسمى حامل اللون، وهو الذي يعطى الصبغة لونها المميز.
 2. توافر العامل الذي يعطى للصبغة القدرة على التأين، والذي يجعلها أكثر نشاطاً، ويجعل لها القدرة على الالتحام بالجسم المصبوغ.
- وتنقسم الصبغات إلي ما يلي:

أولاً: الصبغ البسيط Simple stain: يقصد بالصبغ البسيط استخدام صبغة واحدة فقط في صبغ البكتيريا. ويجرى بأن توضع عدة قطرات من الصبغة على الغشاء البكتيري Smear المثبت لمدة عدة دقائق، ثم يتم غسل الصبغة بماء وتجفف الشريحة. ويتم دراستها باستعمال العدسة الزيتية في المجهر الضوئي.

- ويعتمد الصبغ البسيط على حقيقة أن خلايا البكتيريا تختلف كيميائياً عن الوسط المحيط بها ، لذلك فإنها تصبغ لإظهار التباين بينها وبين الوسط.

- ويفيد في توضيح الفروق الموجودة في حجم الخلايا cell size، وشكلها morphology ، ونظام تجمعها arrangement، (تستخدم الصبغات البسيطة لدراسة وتوضيح الشكل العام لخلايا البكتيري).

ومن أشهر الصبغات المستعملة فيها صبغة أزرق الميثيلين، السفرانين، البنفسج البلوري، الفوكسين.

* الصبغ البسيط الذي يستهدف الخلايا البكتيرية ذاتها يسمى الصبغ المباشر direct stain

* الصبغ البسيط الذي يصبغ الخلفية ويترك الخلايا البكتيرية غير مصبغة يسمى الصبغ السالب negative stain.

ثانياً: الصبغ (المركب) التفريقي compound(differential) stain

لأننا نستعمل في هذه الطرق أكثر من صبغة واحدة.

-الصبغ التفريقي : لأنه طريقة للتمييز، والتفرقة بين أنواع البكتيريا ،اذ تختلف الكائنات فيما بينها كيميائياً وفيزيائياً ، ولذلك فإنها تتفاعل بدرجات مختلفة بالنسبة لطريقة صبغ معينة ، وهذا هو الأساس الذي يعتمد عليه الصبغ التفريقي . وتعتبر صبغة كرام gram stain من أهم طرق الصبغ المركب المتبعة في الدراسات البكتيريولوجية.

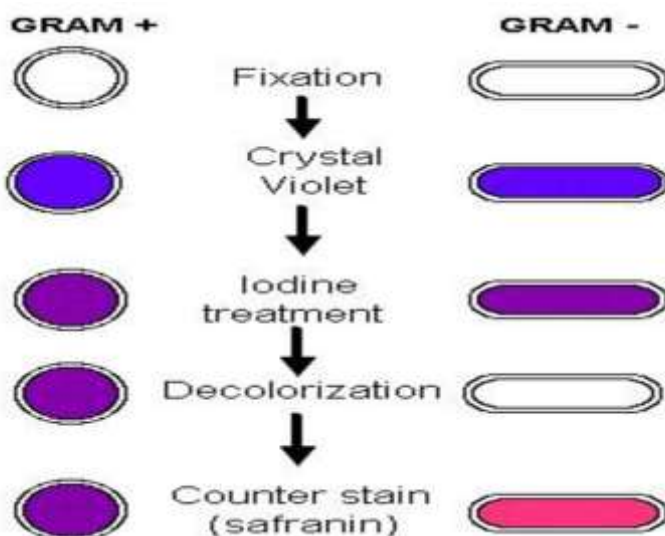
وأول من استعملها(كريستيان كرام 1884 م) لذلك تعرف باسمه. عند إتباع هذه الطريقة نجد أن البكتيريا تنقسم إلى مجموعتين

1-بكتريا تصبغ بالصبغة القاعدية الأساسية (الكريستال البنفسجي) في وجود اليود بدرجة لا- يمكن معها إزالة الصبغة من الخلايا بالغسيل بالكحول أو الأسيتون.

وتصبغ خلايا البكتريا باللون البنفسجي وتعرف بالبكتريا الموجبة لكرام gram positive

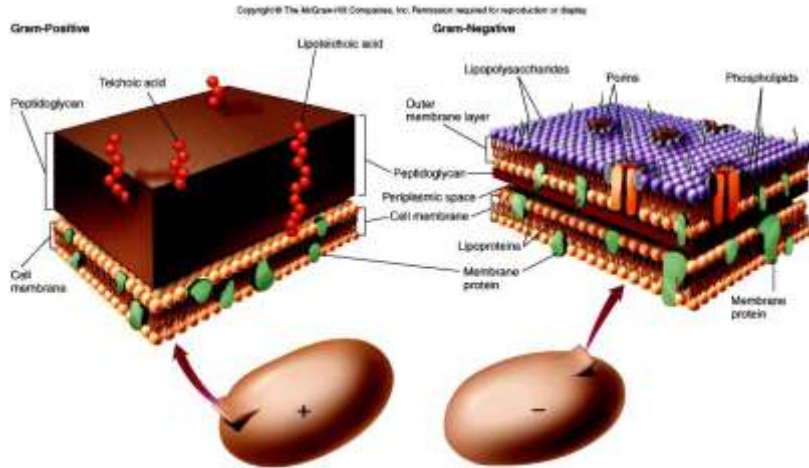
2- بكتريا تزال منها الصبغة البنفسجية بعد الغسل بالكحول بسهولة لذلك (لذلك تصبغ الخلايا- شفافة بعد الغسل بالكحول).

ولتسهيل رؤية خلاياها تصبغ بصبغة حمراء مثل(الصفرانين) وتسمى بالصبغة العكسية. حيث تصبغ خلايا البكتريا باللون الاحمر وتسمى البكتريا السالبة لكرام gram negative .



Step	Gram-positive organisms	Gram-negative organisms
1. Unstained	Clear	Clear
2. Crystal violet	Violet	Violet
3. Iodine enters bacterial cell & forms iodine-crystal violet complexes	Violet	Violet
4. Decolorization (alcohol-acetone)	Violet	Clear
5. Safranin	Purple	Red

شكل (10-10) البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام



شكل (10-11) تركيب الجدار الخلوي في البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام

ثالثاً: الصبغ الخاص special stain: يقصد به صبغات التراكيب Structural stains ويشمل مثلاً

- صبغ الابواغ stain Spore
- صبغ المحفظة stain Capsule
- صبغ الاسواط stain flagellar

عزل البكتيريا Isolation of bacteria

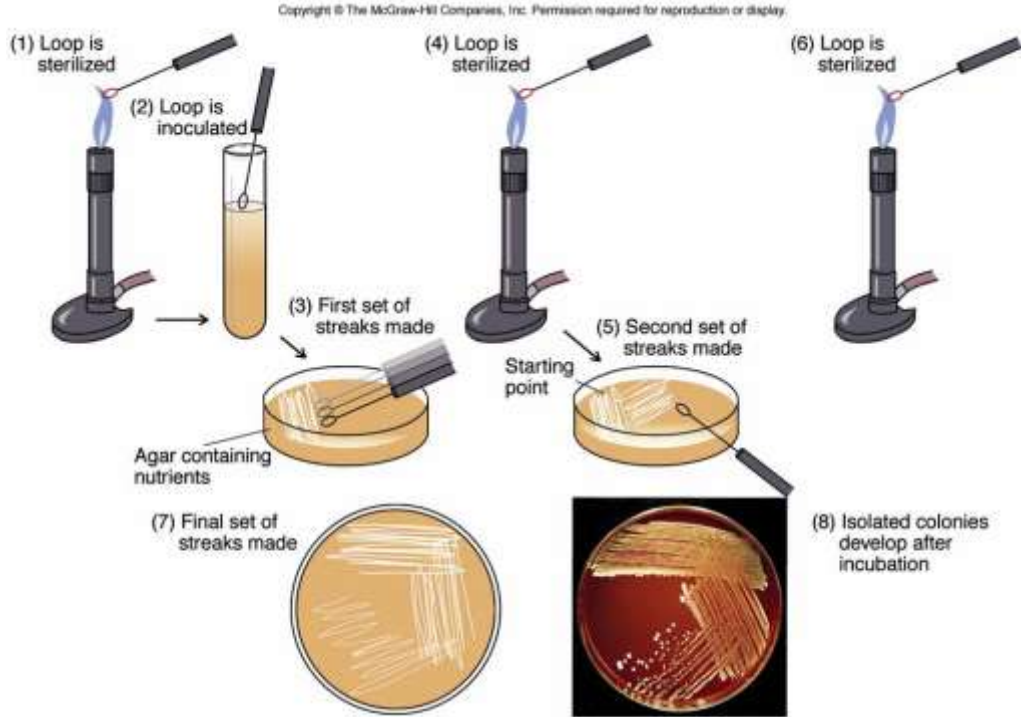
تتطلب الخطوة الأولى في دراسة أي كائن مجهري ، فصل ذلك الكائن عن أشكال الحياة الأخرى كافة بحيث يغدو في بيئته المختبرية الجديدة وحيداً معزولاً عن غيرها ونقياً وتسمى هذه الخطوة بعملية العزل في مزرعة نقية Isolation in pure culture وهذا يعني الحصول على مزرعة نقية Pure culture تحتوي على نوع واحد فقط من الأحياء المجهرية وهي خطوة لها أهميتها الاستثنائية لتجنب الوقوع في الأخطاء عند تشخيص الكائن المجهري وتسمى المزرعة النقية هذه بالعزلة Isolate لحين تشخيصها على مستوى الجنس والنوع .

ويتم تحضير مزارع نقية من المزارع المختلطة هذه بالتقاط مستعمرة مقصودة بواسطة إبرة التلقيح Loop ونقلها إلى سطح وسط زرع صلب حيث تنمو لوحدها في هذا الوسط يمكن الحصول على مزارع نقية بطريقتين أساسيتين هما:

أولاً : تقنية تخطيط الأطباق Streak Plate Technique

وهي أبسط التقنيات المستعملة في تقنية الأحياء المجهرية ولاسيما البكتيريا والحصول عليها بصورة نقية مفردة ويمكن انجازها باتباع الخطوات التالية :

- يحضر وسط زرع صلب مثل Nutrient Agar ويعقم ويبرد ثم يصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة ويترك لحين التصلب التام .
- ينقل مسحة ملئ إبرة التلقيح Loop full من مستعمرة مميزة في مزرعة مختلطة وتخطط على سطح الوسط الزرع الصلب المحضر في الخطوة السابقة ويكون التخطيط برفق لاحظ الشكل ادناه.

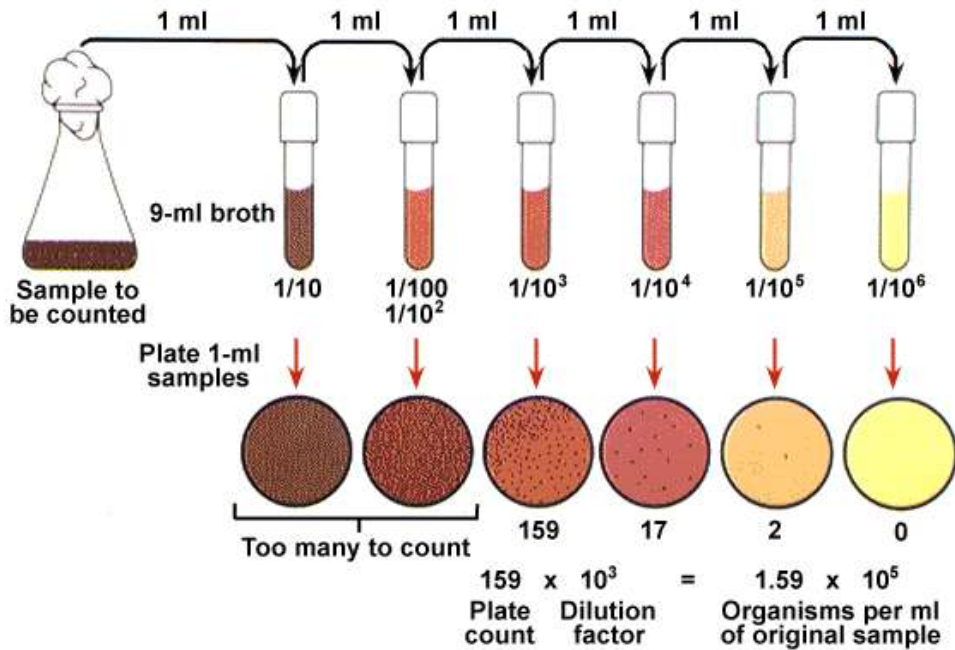


شكل (10-12) عزل البكتريا بطريقة الأطباق المخطوطة Streak Plate method

ثانياً: تقنية الصب في الأطباق Pour Plate Technique

وهي طريقة أخرى للحصول على مستعمرات معزولة مفردة وفيها تخرج مسحة من إحدى المستعمرات المراد تنقيتها بواسطة إبرة التلقيح في وسط زرع صلب مثل Nutrient Agar المحضر في أنابيب اختبار بعد تبريده إلى 50 م° أي قبل تصلبه بقليل . ثم يصب مزيج البكتريا والوسط في أطباق بتري معقمة وتحضن في حرارة مناسبة ولمدة مناسبة فتتشأ على سطح الوسط مستعمرات مفردة ومتماثلة أو متشابهة ، ويمكن إجراء سلسلة من التخافيف في الوسط الزرع الصلب في أنابيب الاختبار قبل

صب الوسط في أطباق بتري بغية تخفيف أو تقليل عدد المستعمرات التي تنمو في الأوساط داخل الأطباق وكما موضح أدناه.



شكل (10-13) عزل البكتيريا بطريقة التخفيف Dilution method

تشخيص البكتيريا

ومن اهم الاختبارات المستخدمة لتشخيص البكتيريا:

اولا: الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests: تعتبر هذه الاختبارات في علم الأحياء المجهرية على درجة كبيرة من الأهمية، فهي تلك الاختبارات الكيميائية التي تُجرى على الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في عينة ما من أجل التعرف عليها لتحديد أنواع البكتيريا والتمييز بين السلالات العائدة لنفس النوع من خلال التعرف على خصائص التمثيل الغذائي المختلفة لكل نوع من أنواع البكتيريا مثل الاختلافات في التمثيل الغذائي للكربوهيدرات والبروتين و للدهون ، وإنتاج بعض الإنزيمات ، والقدرة على استخدام مركب معين وما إلى ذلك كلها تساعد في التعرف عليها، وتشمل عدد كبير من الاختبارات لاحظ الجدول أدناه.

اختبار 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronide (MUG) Test
اختبار اختزال النترات Nitrate Reduction
اختبار اختزال النترت Nitrite Reduction
اختبار o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (ONPG) Test
اختبار حساسية Optochin (P disk) Susceptibility Test
اختبار الاوكسيديز (طريقة كوفاكس) Oxidase Test (Kovac's Method)
اختبار الاكسدة والتخمير Oxidation/Fermentation (of) Medium (CDC Method)
اختبار Oxidation–Fermentation (O–F) Test
اختبار انزيم Phenylalanine Deaminase
اختبار L-PyrrolidonylArylamidase (PYR) Test
اختبار وسط البايروفيت السائل Pyruvate Broth
اختبار تحمل الملح Salt Tolerance Test
اختبار بقعة الاندول Spot Indole Test
اختبار حديد السكر الثلاثي Triple Sugar Iron Agar (TSI)
اختبار اليوريز Urease test
اختبار عامل (V,X) X and V Factor Test
اختبار تحلل النشا المائي Starch Hydrolysis
اختبار تحلل الدهون Lipid Hydrolysis
اختبار المالونيت Malonate Test
اختبار تحلل الكازئين Casein Hydrolysis Test

اختبار 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronide (MUG) Test
اختبار اختزال النترات Nitrate Reduction
اختبار اختزال النترت Nitrite Reduction
اختبار o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (ONPG) Test
اختبار حساسية Optochin (P disk) Susceptibility Test
اختبار الاوكسيديز (طريقة كوفاكس) Oxidase Test (Kovac's Method)
اختبار الاكسدة والتخمر Oxidation/Fermentation (of) Medium (CDC Method)
اختبار Oxidation–Fermentation (O–F) Test
اختبار انزيم Phenylalanine Deaminase
اختبار L-PyrrolidonylArylamidase (PYR) Test
اختبار وسط البايروفيت السائل Pyruvate Broth
اختبار تحمل الملح Salt Tolerance Test
اختبار بقعة الاندول Spot Indole Test
اختبار حديد السكر الثلاثي Triple Sugar Iron Agar (TSI)
اختبار اليوريز Urease test
اختبار عامل (V,X) X and V Factor Test
اختبار تحلل النشا المائي Starch Hydrolysis
اختبار تحلل الدهون Lipid Hydrolysis
اختبار المالونيت Malonate Test
اختبار تحلل الكازئين Casein Hydrolysis Test

ثانيا: التشخيص بنظام API 20E:

يعتبر من الاختبارات التشخيصية المنظورة اذ يمكن من اجراء عدد من الاختبارات في نفس الوقت كما يعتبر من الاختبارات ذات النتائج الدقيقة جدا يتكون الاختبار من شريط يحتوي على عدد من الحجرات وكل حجرة تمثل اختبار تشخيص معين ويجري في ان واحد. لاحظ الشكل أدناه

API 20 E after incubation...Positive results for all tests :



Microbiology Info.com

API 20 E after incubation...Negative results for all tests :



ثالثا: نظام التشخيص الالي للبكتريا:

ويكون باستعمال جهاز الـ Vitek systems اذ يتخدم الجهاز لتشخيص البكتيريا ولاجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية من خلال تحديد التغير باللون او العكورة في بطاقات بلاستيكية خاصة ملقحة بالبكتيريا.



شكل (10-14) جهاز الفايترك

رابعاً: التشخيص على المستوى الجزيئي باستخدام تقنية (PCR) Polymerase chain reaction

يستخدم هذا الفحص لتشخيص كثير من الاحياء الدقيقة في العينات المرضية ويعتمد على تكثير الـ DNA الموجود في العينة المرضية من اجل اجراء الفحوصات اللازمة على DNA بسهولة.

خامسا: الفحوصات المصلية Serological test:

ترتكز هذه الفحوصات على اساس تفاعل الاجسام المضادة Antibody التي كونها الجسم نتيجة للاصابة بجرثومة معينة مع انتيجينات antigen محضرة في المختبر وخاصة بالجرثومة نفسها. اذ ترتفع الاجسام المضادة في جسم الانسان تدريجيا بعد الاصابة باية جرثومة وتكون هذه الاجسام المضادة بالنوع المسبب فقط لذلك فان الفحوصات المصلية مفيدة للتشخيص المبكر للاصابات الجرثومية بشكل عام . ويضم هذا النوع من التشخيص الفحوصات الاتية:

- 1- فحوصات تخثر الدم agglutination test
- 2- فحص تثبيت المكمل Complement fixation test
- 3- الفحوصات التالقية المناعية غير المباشرة Indirect immune fluorescence tests

بعد عزل وتنقية البكتيريا، يتم حفظها بطرق مختلفة وذلك من أجل تعريفها أو استخدامها في الدراسات المختلفة لأغراض طبية، أو صناعية وغيرهما. ويوجد العديد من طرق الحفظ التي تستخدم لحفظ البكتيريا لفترات قصيرة أو طويلة المدى..

أولاً: الحفظ لفترات قصيرة :طريقة الحفظ باستخدام أنابيب الآجار المائل (Agar Slant):

ثانياً: الحفظ لفترة طويلة: في هذه الطريقة تصل فترة الخزن الى 10 سنوات وتتم بعدة طرق.

• أ- التجفيد lyophilization: تتم بتح يضر العالق البكتيري وتجميده بسرعة وذلك باستخدام مزيج الثلج الجاف والكحول ثم يجفف باستخدام الـ vacuum ويحفظ بدرجة 4 م°.

• ب- التجميد Freezing: تتلخص هذه الطريقة باستخدام الكسرين او الكليسيرول Glycerol بتركيز 86 % بعد تح يضر العالق البكتيري بعمر 24 ساعة ويحفظ بدرجة 80 م° تيسخدم الكليسيرين لحماية الخلايا من التجميد.

• ج- تجفيف Drying: الاحياء المنتجة للسبورات : في هذه الطريقة مزارع التربة والرمل وكاربونات الكالسيوم احيث يعقم المزيج و يلحق بعالق السبورات ثم يتم التخلص من الماء وبعدها يحفظ بدرجة 4 م° تستخدم هذه الطريقة مع الاحياء المجهرية كالاسبرجلس Aspergillus و البنسيليوم Penicillium والباسلس Bacillus.

	السيرة الذاتية والعلمية فوز عبد السلام خليل الصفار الشهادة/ دكتوراه الجهة المانحة/ جامعة الموصل (العراق) بالتعاون مع جامعة Leicester (بريطانيا) اللقب العلمي/ مدرس قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق
---	--

المعلومات الشخصية	
الاسم	فوز عبد السلام خليل الصفار
المواليد	1980/4/11
مكان الولادة	العراق/ موصل
الجنس	انثى
الجنسية	عراقية
الحالة الزوجية	متزوجة
رقم الهاتف الجوال	07716982530
المعلومات الأكاديمية	
اللقب العلمي	مدرس
القسم العلمي	قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل
التخصص العام	احياء
التخصص الدقيق	تقنيات حياتية
البريد الإلكتروني	Dr.fawz@uomosul.edu.iq
بوابة البحث العلمي	https://www.researchgate.net/profile/Fawz_Al_Saffar
الباحث العلمي	https://scholar.google.com/citations?user=a-UkSV4AAAAJ&hl=ar
ORCID	0000-0001-5465-3697
الألقاب العلمية	
مدرس	2011 /9 /11

الفصل الحادي عشر

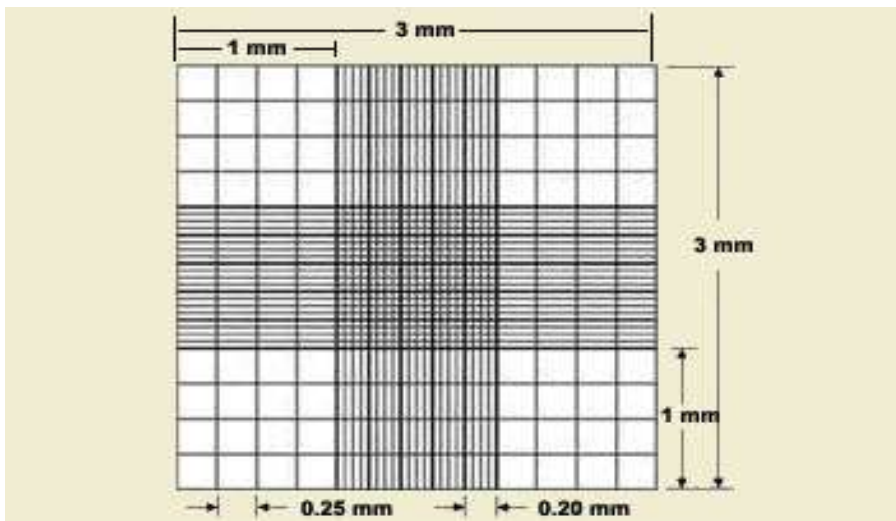
قياس عدد وابعاد الخلايا المجهرية باستخدام الأدوات اليدوية والبرامج الحاسوبية

مصطفى رشيد مجيد القيسي

حجرة أو جنبر العد Neubauer chamber's (Hemocytometer or Haemocytometer) وهي واحدة من التقنيات المستخدمة لعد الخلايا هي أداة لتقدير تركيز أو كثافة الخلايا في العينة (صورة 11-1). تحتوي على حجرة بعمق 0.1 مم وشبكة (grid) من المربعات المقاسة بدقة. يتم تحميل Loading الخلايا المجهرية مثل البكتيريا والدم في Hemocytometer هو عبارة عن حجرة مربعة منحوتة في جزء من الزجاج السميكة الذي له عمق محدد (بعمق 0.1 مم). يتم استخدامه لحساب كثافة الخلايا (Cells density) في المعلقات. اخترع من قبل لويس-تشارلز مالاسيز (Louis Charles Malassez) في الأصل لعد خلايا الدم. في وقت لاحق، بدأ علماء الأحياء والباحثون تطبيقه على جوانب أخرى. إذ تم استخدامه في عد ابواغ الفطريات والخميرة والطحالب والحيوانات المنوية وأنواع أخرى من الخلايا البشرية والحيوانية. أصبح من الضروري وجود عداد الكريات مع شبكات مختلفة لعد العناصر الأصغر. قسم شبكة عداد الكريات الحالي هو 3 مم × 3 مم. يتكون Hemocytometer هذا من شبكة من 9 مربعات كبيرة بأبعاد 1 مم لكل منها. تنقسم جميع المربعات الموجودة في الزوايا بالتساوي إلى 16 مربعاً أصغر لكل منها. أي من هذه المربعات الأصغر حجمها 1 مم / 4 = 0.25 مم. أما المربع المركزي الكبير فيختلف عن الآخر، الموجود في الزوايا. وهي مقسمة إلى 25 مربعاً أصغر يبلغ أبعاد كل منها 0.2 مم (200 ميكرومتر). وينقسم كل مربع من هذه المربعات الصغيرة البالغ عددها 25 مربعاً بدوره إلى 16 مربعاً صغيراً يبلغ أبعاد كل منها 0.05 مم. لذلك، يتكون المربع المركزي الكبير من 400 مربع صغير كما موضح بالشكل 11-2. لا يتم عادة استخدام باقي المربعات الموجودة. طريقة الاستخدام تتم بتحميل Loading المعلق الحامل للخلايا المجهرية ويتم تحميله على منطقة على شكل حرف V الموجود في بعض التصاميم. قبلها يجب تنظيف Neubauer chamber's أو السطح الشبيه بالمرآة بعناية باستخدام ورق العدسة والإيثانول وضع الشريحة Cover slips على سطح العد قبل إضافة المعلق. ثم تم حقن معلق بوع باستخدام ماصة باستور والمعلق كافي بحيث يتم تغطية السطح الذي يشبه المرآة. ثم يتم وضع حجرة العد على مسرح المجهر والتركيز على شبكة العد في قوة التكبير المنخفضة ومن ثم قوة تكبير أعلى.



صورة (1-11) شريحة العد Hemocytometer



شكل (2-11) يوضح ابعاد المربعات الموجودة على شريحة العد Hemocytometer

القانون العام لحساب كثافة الخلايا (Cell/mL):

Cell density (Cell/mL) = Average Cells * dilution factor / Volume of square (mL)

• Average Cells = معدل عدد الخلايا في المربع الواحد ذو الأبعاد المتشابه.

Average Cells = cells Total / Number of Square

• Dilution factor = حسب مستوى التخفيف كما مذكور في الأمثلة الآتية:

No dilution: dilution factor is

1. 1 ml sample + 1 ml water: dilution factor is 2
(1:1=2)
2. 1 ml sample + 9 ml water: dilution factor is 10
(1:9=10)
3. 2 ml sample + 10 ml water: dilution factor is 6
(2:10=6)
4. $10^{-2}=100$

(mL) Volume of square = حسب نوع المربع كما موضح في الصورة
لحساب حجم المربع الواحد يتم ضرب طول الظلعيين في العمق كما في القانون الآتي:

$L * L * D = \text{Volume of square (mm}^3\text{) or direct in (cm}^3\text{)}$

بما ان ابعاد اضلاع المربعات مقاسة بـ mm تحول الى cm^3 والذي يساوي mL

$1000 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$

$\text{Volume of square (mm}^3\text{)}/1000(\text{mm}^3) = 1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$

وبذلك يمكن ان يكون القانون النهائي بعد التحويل

القانون النهائي العام cell/ml

الان نأتي الى أنواع المربعات الموجودة في Hemocytometer كما موضح بالشكل
2. قسمت الى أربعة أنواع: مربع كبير (A) ومربع متوسط نوعين (B1، B2) و مربع صغير (C) و ابعاد وعدد المربعات المتشابهة.

- 1) **Large square (A)** = $1 \times 1 \times 0.1$ no. of square 9.
- 2) **Medium square (B1)** = $0.25 \times 0.25 \times 0.1$ no. of square 16 in each of Large square 4 (A) (Total Number it's 64 square).
- 3) **Medium square (B2)** = $0.20 \times 0.20 \times 0.1$ no. of square 25 in central square of Hemocytometer (3mm).
- 4) **Small square (C)** = $0.05 \times 0.05 \times 0.1$ no. of square 16 in each of Medium square (B2) in each of Medium square (B2) (Total Number it's 400 square).

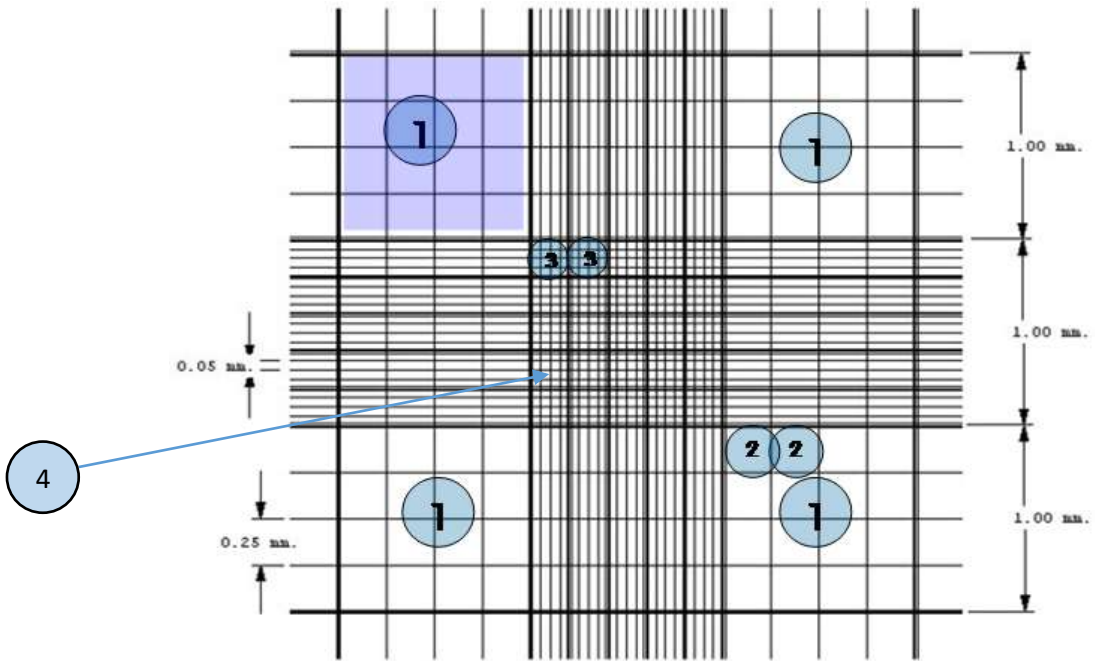
mm³ trans to Volume of square (mL)

$$\frac{\text{Average Cells} \times \text{dilution factor}}{\text{Volume of square (mm}^3\text{)}} \cdot \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \cdot \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}}$$

$$\frac{\text{Average Cells} \times \text{dilution factor} \times 1000}{\text{Volume of square mL}}$$

القانون النهائي العام cell/ml

حسب نوع المربع

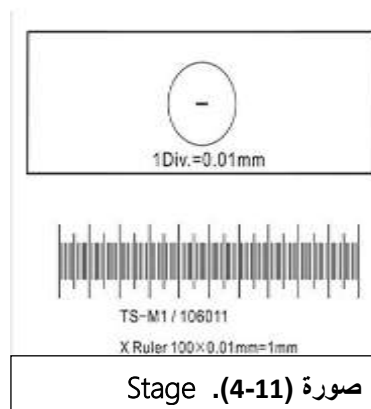
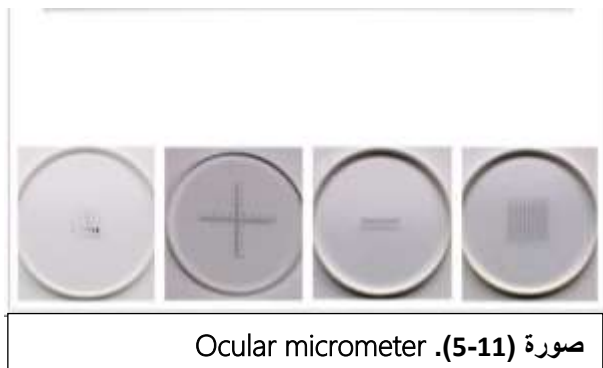


شكل (3-11). يوضح أنواع المربعات الموجودة على شريحة العد
Hemocytometer

قياس ابعاد الشرائح المجهرية عن طريق مقياس محدد

1- الطريقة (Ocular Micrometer (eyepiece graticule). with the stage micrometer

هو أداة شائعة لقياس أشكال أو أبعاد الأشياء المجهرية مثل الخلايا والعضيات من خلال المجهر البصري Optical microscope يمكن تنفيذ ذلك بشكل تقليدي باستخدام مسطرة مايكروية stage micrometer (صور 4-11)، لتعيير العدسة العينية المدرجة التي تسمى ocular micrometer او eyepiece graticule (صورة 5-11).



القانون العام لمعايرة العدسة العينية المدرجة:

Stage micrometer/Ocular micrometer

لاستخراج قيمة وحدة قياس العدسة Ocular unit

يتبع الخطوات الآتية:

أولاً: تحويل mm إلى μm

$$1\text{mm} = 1000 \mu\text{m}$$

ثانياً: تطبيق القانون العام

$$\text{One Ocular unit } (\mu\text{m}) = \text{Stage micrometer} \times 1000 / \text{Ocular micrometer}$$

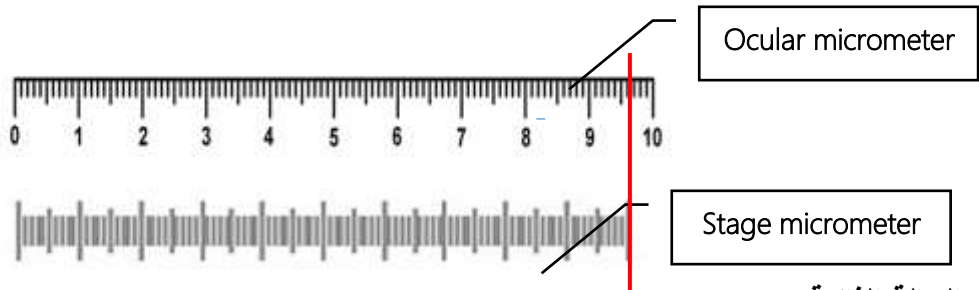
التطبيق:

الحالة الأولى:

عندما يكون كل تدرج Stage micrometer ضمن العدسة العينية المدرجة Ocular micrometer نستخرج وحدة القياس حسب المثال الآتي

إذا كان لدينا Stage micrometer بطول 1 mm حسب الشركة المنتجة كما في الصورة 2-11. وكانت حدوده ضمن الوحدة الرابعة (96 units) للعدسة المدرجة. يكون القانون بالصيغة الآتية:

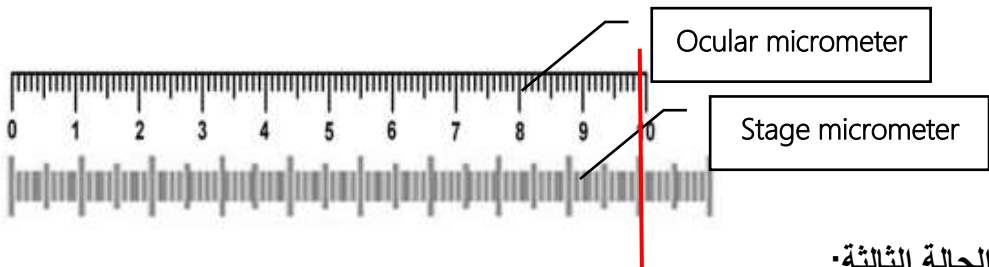
$$\text{One Ocular unit } (\mu\text{m}) = 1 \text{ mm} \times 1000 / 96 = 10.42 \mu\text{m}$$



الحالة الثانية:

عندما يكون كل تدرج العدسة العينية المدرجة Ocular micrometer ضمن Stage micrometer مثلاً عند التدرج السادس أي (0.9 mm) نستخرج وحدة القياس حسب المثال الاتي:

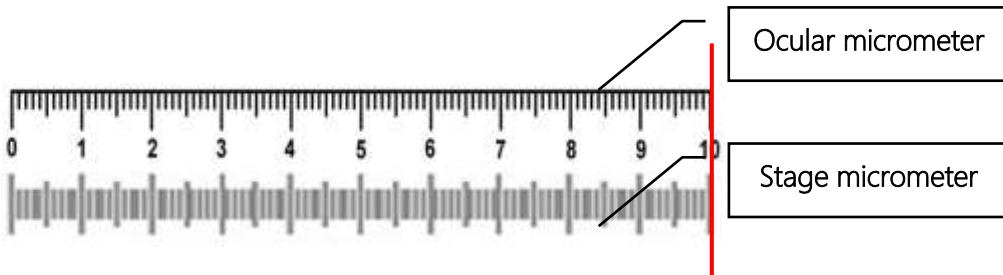
$$\text{One Ocular unit } (\mu\text{m}) = 0.9 \text{ mm} * 1000 / 100 = 9 \mu\text{m}$$



الحالة الثالثة:

التطابق تماماً بين التدرجين

$$\text{One Ocular unit } (\mu\text{m}) = 1 \text{ mm} * 1000 / 100 = 10 \mu\text{m}$$



هذه الحالات الثلاثة تحدث حسب قوة تكبير المجهر.

2- الطريقة الحاسوبية تحليل الصور analyzing bio-images automatically by computer

المجهر البصري Optical microscope: هو أداة شائعة لقياس أشكال أو أبعاد الأشياء المجهرية مثل الخلايا والعصيات. يمكن تنفيذ ذلك بشكل تقليدي باستخدام مسطرة شفافة ، أو بدقة مع ميكرومتر العين (graticule العدسة). لمعايرة جريش العدسة ، يجب استخدام ميكرومتر المرحلة. كل هذه التقنيات قابلة للتطبيق في عملية تحليل الصور البيولوجية تحت المجهر. يمكن تحقيق ذلك من خلال التعاون بين علماء الأحياء والمتخصصين في التعرف على الأنماط ومعالجة الصور. من ناحية أخرى ، يمكن حل المهمة بسهولة باستخدام تقنية موجودة أو مجموعة من التقنيات المناسبة. والتي ستكون مفيدة لتحليل الصور الحيوية تلقائياً بواسطة الكمبيوتر مثل ImageJ و Fiji و OpenCV و Matlab و R و MetaMorph وبرامج التعرف على الأنماط.

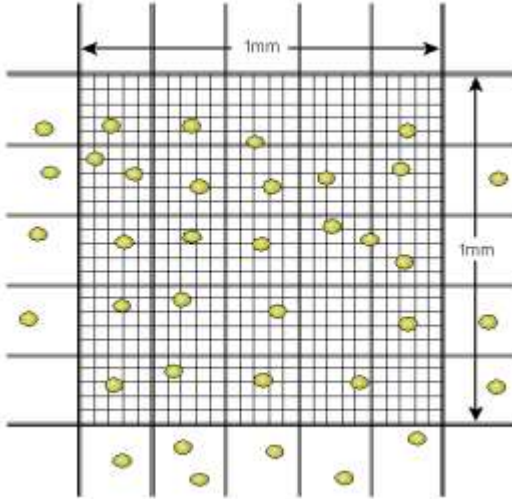
أصبح تقدم تقنيات التصوير ، وخاصة التصوير المجهرية اذ يتم توفير نتائج التصوير كصور ثابتة أو مقاطع فيديو. كما يتم تخيل سلوك وتوزيع الجزيئات في الخلايا من خلال تقنيات متعددة، مكن علماء الأحياء تصوير مختلف الظواهر البيولوجية. غالباً ما يقوم علماء الأحياء بإجراء فحوصات يدوية (بالعين) لتحليل الصورة الحيوية bio-image analysis. هذا يتطلب جهداً كبيراً وتركيزاً. إذا كان هناك العديد من العضيات المستهدفة، يلزم بذل جهود أكبر. ونتيجة لذلك، من الصعب تحليل عدد كبير من الصور الحيوية لنتائج تحليل موثوق بها. لذا التجأ الى البرامج الحاسوبية التي ذكرت سابقاً. يمكن للكفاءة الحسابية إجراء عدد من المهام البيولوجية. يعد استخدام تقنيات معالجة الصور لتحليل الصور التلقائي بالكامل إحدى هذه المهام والواجبات. يمكن إثبات العديد من الدراسات البيولوجية العلمية في المستقبل، أو حتى في الوقت الحاضر، من خلال هذه التقنيات. يمكن أيضاً اكتشاف حقائق علمية جديدة. مرة أخرى، يمكن للتعاون بين علماء الأحياء ومتخصصي معالجة الصور أن ينجح في هذا الجانب

الخطوات: Procedure

يمكن إجراء عملية قياس الخلايا الدقيقة باستخدام الصور بثلاثة مراحل. أولاً ، يتم تحميل الصورة ومعايرتها داخل البرنامج (image uploading and calibration)، ثانياً: الكشف (تحديد الكائن المقصود)، ثالثاً إجراء القياس المطلوب (measurement). كما موضح بالصور ادناه.

تتلخص هذه الطريقة بحساب ابعاد الأنواع المختلفة للخلايا المجهرية ومساحتها، المفردة (خلية بكتيرية، ابواغ فطرية، خلايا الدم) والمتجمعة (انسجة نباتية، حيوانية، غزل فطري) أو أي أجزاء دقيقة مايكروية من خلال استعمال البرنامج الحاسوبي digimazer أو Image-j مع الصورة المأخوذة تحت المجهر الضوئي المركب مع مقياس معروف الابعاد (Scale) كجبر العد Hemocytometer (صورة 11-4). اذا يعمل هذا البرنامج على تحليل ابعاد ما موجود في الصورة دون الحاجة الى استعمال العدسة المدرجة وتعيرها بالشريحة المايكروية.

مبدأ عمل برامج تحليل الصور حسابيا ورياضيا يعتمد على وجود مقياس رسم معروف الابعاد موجود ضمن الصورة المطلوب تحليلها فعند ادخال قيمة هذا المقياس في البرنامج يمكن قياس وحساب ابعاد أي خلية مجهرية موجودة في الصورة المأخوذة تحت المجهر الضوئي وأفضل مقياس معروف الابعاد هو شريحة العد المجهرى Haemocytometry نوع (Improved Neubauer) وكما هو موضح بالشكل 3. يتم قياس الابعاد بعد اخذ الصور تحت المجهر الضوئي ونقلها الى الحاسبة وتحليلها بأحد برامج تحليل الصور وهو اما برنامج Image-j او Digimizer وكما موضح بالصور 6-11 - 13-11 .

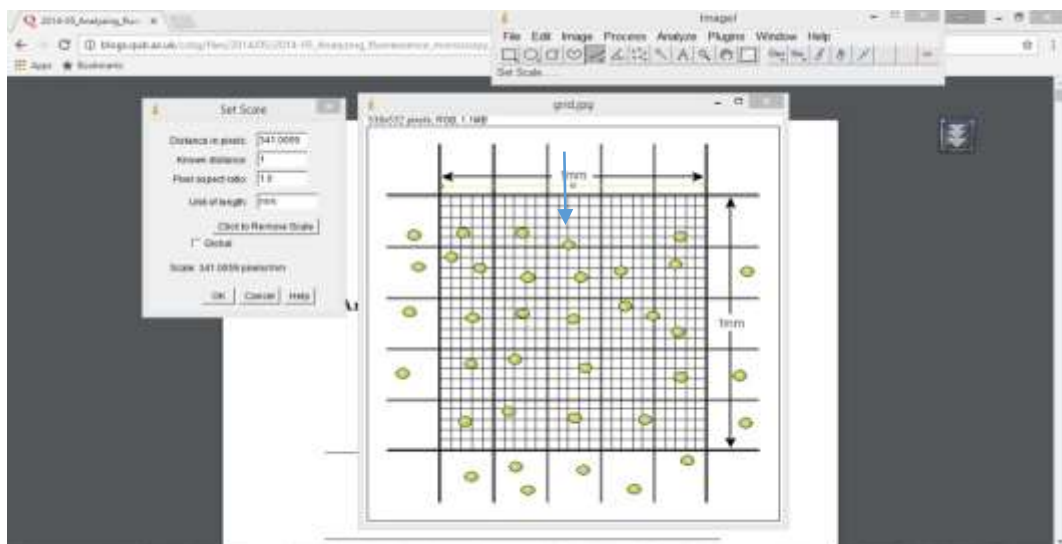


شكل (7-11). هكذا تظهر الصور تحت المجهر
باستعمال شريحة العد *Haemocytometer*

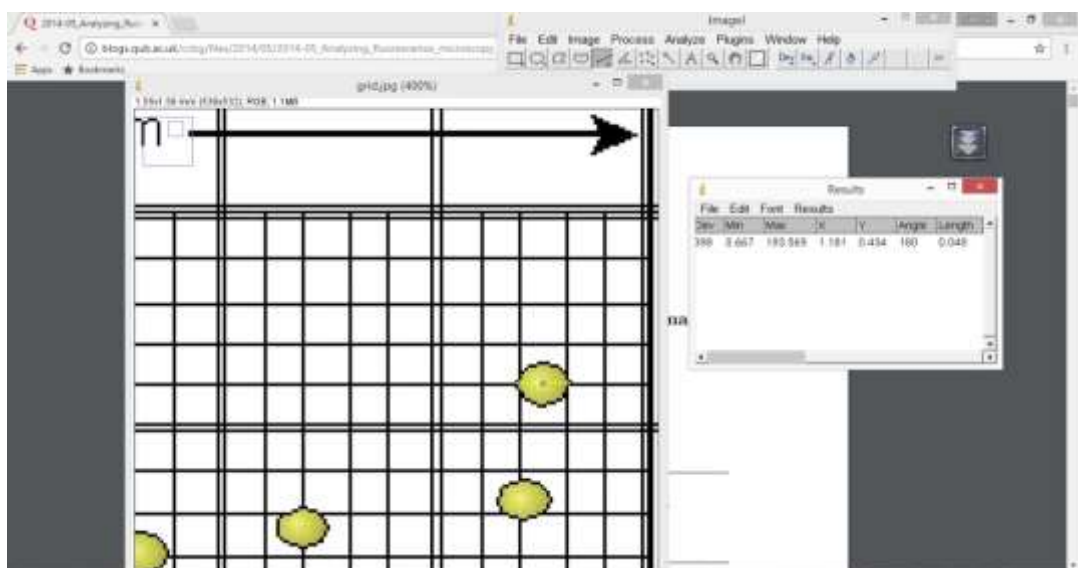


صورة (6-11). شريحة العد
Haemocytometer

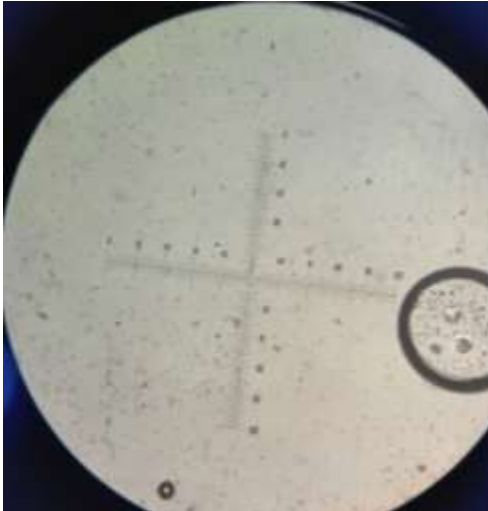
تنقل الصور الى الحاسبة وتحلل ضمن برنامج تحليل الصور



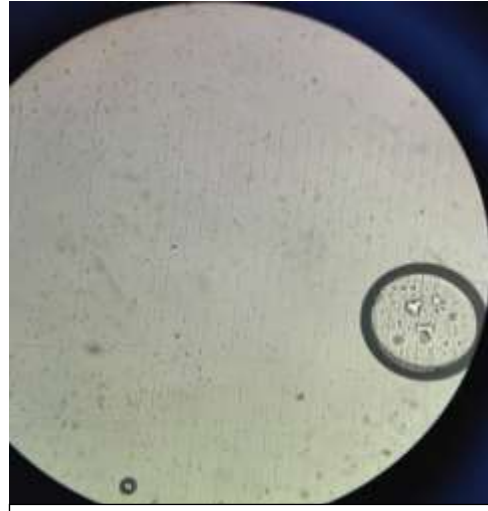
صورة (8-11) معايرة البرنامج حسب ابعاد مربعات شريحة العد



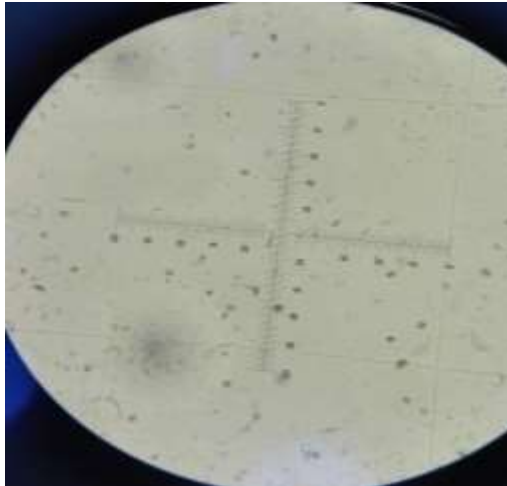
صورة (9-11). يوضح نتيجة قياس عرض الخلية



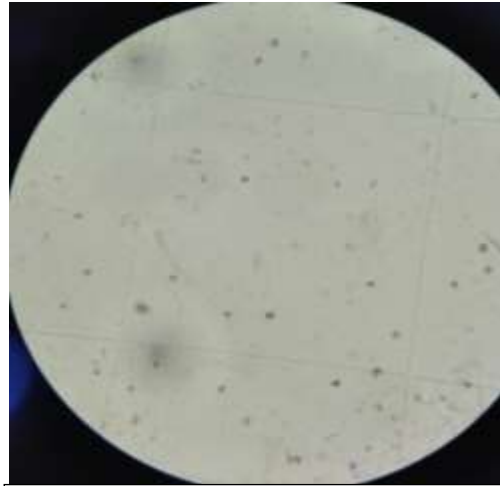
صور (11-11). توضح جهاز العد تحت المجهر
تحت القوة 10X مع العدسة المدرجة Ocular
Micrometer



صور (10-11). توضح جهاز العد تحت
المجهر تحت القوة 10X بدون العدسة المدرجة
Ocular Micrometer



صور (11-13). توضح جهاز العد تحت المجهر
تحت القوة 40X مع العدسة المدرجة Ocular



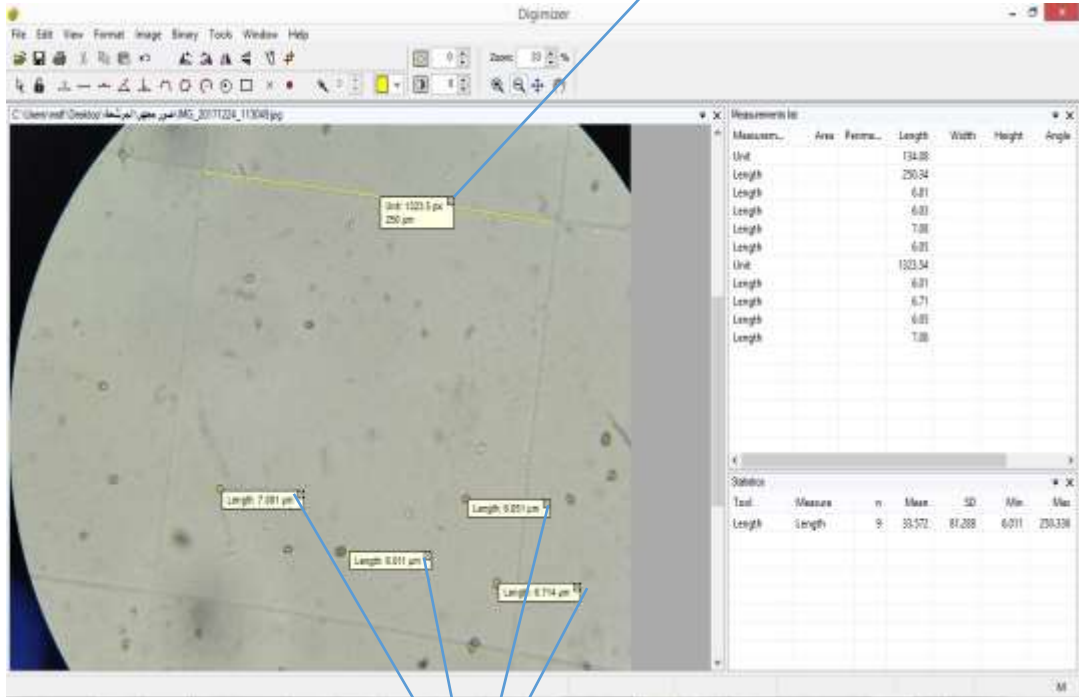
صور (11-12). توضح جهاز العد تحت المجهر
تحت القوة 40X بدون العدسة العينية المدرجة

بعد معايرة Calibration العدسة المدرجة (Ocular Micrometer) مع الشريحة
المدرجة Stage Micrometer.

فقد كانت كل وحدة من وحدات التدرج للعدسة المدرجة للقوة X40 تساوي 26
مايكرومتر وتم التأكد من طول ضلع المربع الموجود على جنب العد ذو البعد 0.25

Agaricus bisporus mm او 250μ كما في الصورة 11-16 وقياس باقي ابواغ الفطر

معايرة البرنامج من خلال طول الضلع
المعلوم في جنبه العد كما موضح في
الاشكال السابقة.



تقدير ابعاد الابواغ عن طريق البرنامج والتي
كانت مقارنة للقياس عن طريق التدرج المعير
بالعدسة مع الشريحة المدرجة.

صورة (11-14) . توضح معايرة البرنامج من خلال اضلاع المربع لشريحة العد المجهرى Haemocytometry نوع (Improved Neubauer) وتقدير ابعاد الابواغ تحت قوة التكبير 40X

بالشريحة المدرجة Stage Micrometer والعدسة المدرجة Ocular
Micrometer فضلا عن أي خلية او بوع اخر يقع او لا يقع ضمن التدرجات وبأعداد
كبيرة وسرعة ودقة عالية.

References:

1. Agar, A. 1988. Calibration of microscopes for magnification and resolution. *Microscopy and Analysis*, 6, pp.19-22.
2. Alqaisi, M.R., Mohsin, R.M. and Ahmed, T.S. 2020. Efficiency of image analysis as a direct method in spore dimensions measurement. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(53&54):57-64.
3. Bjørnsen, P.K. 1986. Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(6), pp.1199-1204.
4. da Silva Tavares, J.M.R. 2010. Image processing and analysis: applications and trends. In *AES-ATEMA'2010 Fifth International Conference*
5. Green, M.R. and Sambrook, J. 2019. Estimation of Cell Number by Hemocytometry Counting. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(11), pp.pdb-prot097980.
6. Kanade, T., Yin, Z., Bise, R., Huh, S., Eom, S., Sandbothe, M.F. and Chen, M. 2011, January. Cell image analysis: Algorithms, system and applications. In *2011 IEEE Workshop on Applications of Computer Vision (WACV)* (pp. 374-381). IEEE.
7. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. 2010. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.)
8. Massana, R., Gasol, J.M., Bjørnsen, P.K., Blackburn, N., Hagstrøm, Å., Hietanen, S., Hygum, B.H., Kuparinen, J. and Pedrós-Alíó, C. 1997. Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Scientia Marina* 61(3): 397-407
9. Psenner, R. 1991. Determination of bacterial cell volumes by image analysis. *Internationale Vereinigung*

für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen, 24(4), pp.2605-2608.

10. Psenner, R. 1993. Determination of size and morphology of aquatic bacteria by automated image analysis. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, pp.339-345.

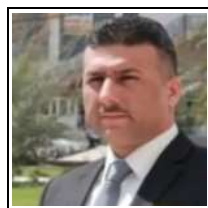
11. Shamir, L., Delaney, J.D., Orlov, N., Eckley, D.M. and Goldberg, I.G. 2010. Pattern recognition software and techniques for biological image analysis. *PLoS computational biology*, 6(11).

12. Smith, K., Piccinini, F., Balassa, T., Koos, K., Danko, T., Azizpour, H. and Horvath, P. 2018. Phenotypic image analysis software tools for exploring and understanding big image data from cell-based assays. *Cell systems*, 6(6), pp.636-653.

13. Stolze, N., Bader, C., Henning, C., Mastin, J., Holmes, A.E. and Sutlief, A.L. 2019. Automated image analysis with ImageJ of yeast colony forming units from cannabis flowers. *Journal of microbiological methods*, 164, p.105681

14. Uchida, S. 2013. Image processing and recognition for biological images. *Development, growth & differentiation*, 55(4), pp.523-549.

15. Valous, N.A. and Sun, D.W. 2012. Image processing techniques for computer vision in the food and beverage industries. In *Computer Vision Technology in the Food and Beverage Industries* (pp. 97-129). Woodhead Publishing.



السيرة الذاتية والعلمية

أ.د. مصطفى رشيد مجيد

دكتوراه، أستاذ

قسم البستنة وهندسة الحدائق، كلية الزراعة، جامعة تكريت، تكريت، العراق

المعلومات الشخصية

● الاسم	مصطفى رشيد مجيد القيسي
● المواليد	11/2/1979
● مكان الولادة	بغداد، العراق
● الجنس	ذكر
● الجنسية	عراقي
● الحالة الزوجية	متزوج
● عدد الأطفال	3
● رقم الهاتف الجوال	07705357951
● اللقب العلمي	أستاذ دكتور
● القسم العلمي	قسم البستنة، كلية الزراعة، جامعة تكريت
● التخصص العام	علوم البستنة
● التخصص الدقيق	التقانات الاحيائية
● البريد الإلكتروني	dr.mustafa.r.m@tu.edu.iq
● بوابة البحث العلمي	https://www.researchgate.net/profile/Mustafa-Alqaisi
● الباحث العلمي	https://myaccount.google.com/?utm_source=OGB&tab=kk&utm_medium=app
● ORCID	https://orcid.org/0000-0002-2346-9472

التحصيل الدراسي

الشهادة	السنة	التخصص	الجهة المانحة
● دكتوراه	2015	تقانات احيائية - فطريات غذائية	كلية الزراعة - جامعة بغداد - العراق
● ماجستير	2006	فطريات غذائية	كلية الزراعة - جامعة بغداد - العراق
● بكالوريوس	2003	علوم البستنة	كلية الزراعة - جامعة بغداد - العراق

الألقاب العلمية

● مدرس مساعد	22 / 6 / 2006
● مدرس	4 / 12 / 2009
● أستاذ مساعد	26 / 5 / 2015
● أستاذ	19/4/ 2022

عدد الكتب المؤلفة 1

تصميم وتحليل التجارب الاحيائية احصائياً باستخدام برنامج Genstat

الفصل الثاني عشر

البيولوجي الجزيئي

د. نورس نجاح مبارك راضي

Introduction of Molecular biology

مقدمة عن

البيولوجي الجزيئي

البيولوجي الجزيئي : دراسة علم الأحياء على المستوى الجزيئي . البيولوجيا الجزيئية تختص بدراسة تركيب الجينات ووظائفها على المستوى الجزيئي لفهم الأساس الجزيئي للوراثة والتنوع الجيني وأنماط التعبير عن الجينات .

الجين (gene) : هو الوحدة الأساسية للمادة الوراثية في الكائنات الحية التي تكون على شكل تسلسلات خطية من النيوكليوتيدات (ال DNA) ويشكل الجين جزء من DNA الذي يحمل المعلومات الجينية .

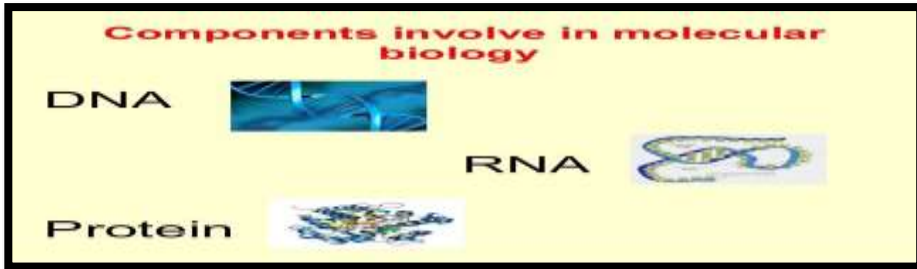
يتداخل هذا المجال مع مجالات أخرى من البيولوجيا والكيمياء ، خاصة الوراثة والكيمياء الحياتية. يهتم علم الأحياء الجزيئي بشكل أساسي بفهم التفاعل بين الأنظمة الخلوية المختلفة ، بما في ذلك التفاعل بين الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (DNA) والحمض النووي الريبوزي RNA والتخليق الحيوي للبروتين إضافة إلى آليات تنظيم هذه العملية وكافة العمليات الحيوية.

• تقوم الحياة على ثلاث جزيئات بيولوجية رئيسية : الشكل (12-1)

1- **الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (DNA)** : يحمل المعلومات الوراثية التي تنظم عمل الخلية.

2- **الحمض النووي الريبوزي (RNA)** : يعمل على ترجمة المعلومات الوراثية المخزنة في DNA إلى بروتين من خلال نسخ هذه المعلومات ثم تحويلها إلى بروتين.

3- **البروتينات** : مركبات تعمل على إرسال إشارات إلى خلايا أخرى وتنظم نشاط الجينات ولها العديد من الوظائف داخل الجسم .



الشكل (12-1) الجزيئات البيولوجية الرئيسية للكائن الحي

الحامض النووي منقوص الاوكسجين

الحامض النووي يحتوي على المعلومات الجينية المستخدمة في تطوير وعمل جميع الكائنات الحية المعروفة وبعض الفيروسات .

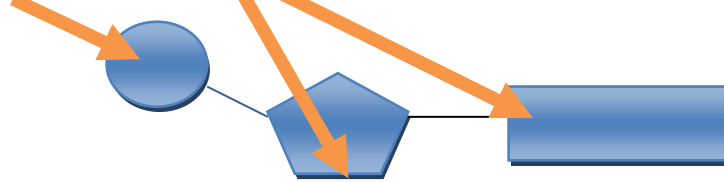
تركيب الحامض النووي : يحتوي الحامض النووي على بنية حلزونية مزدوجة تتكون من مجموعة الفوسفات والسكر رايبوزي وقاعدة نيتروجينية (A ، C ، G ، T) ، حيث يعتبر النيوكلئوتيد الوحدة الأساسية لبوليمر الحامض النووي . وتقرأ سلاسل الحامض النووي في اتجاه النسخ من : 5 ' نهاية إلى 3 ' نهاية .

5' ATTTAGGCC 3'

3' TAAATCCGG 5'

DNA has three main components :

- Deoxyribose (pentose sugar)
- Nitrogenous base
- Phosphate group



• القواعد النيتروجينية في الدنا : تقسم الى مجموعتين :

❖ البيريميدينات والبيورينات:

1- بيريميدينات : (مصنوعة من حلقة واحدة)



• ثايمين

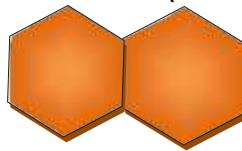
• سيتوسين

2- البيورينات (مصنوعة من حلقتين)

• كوانين

• ادنين

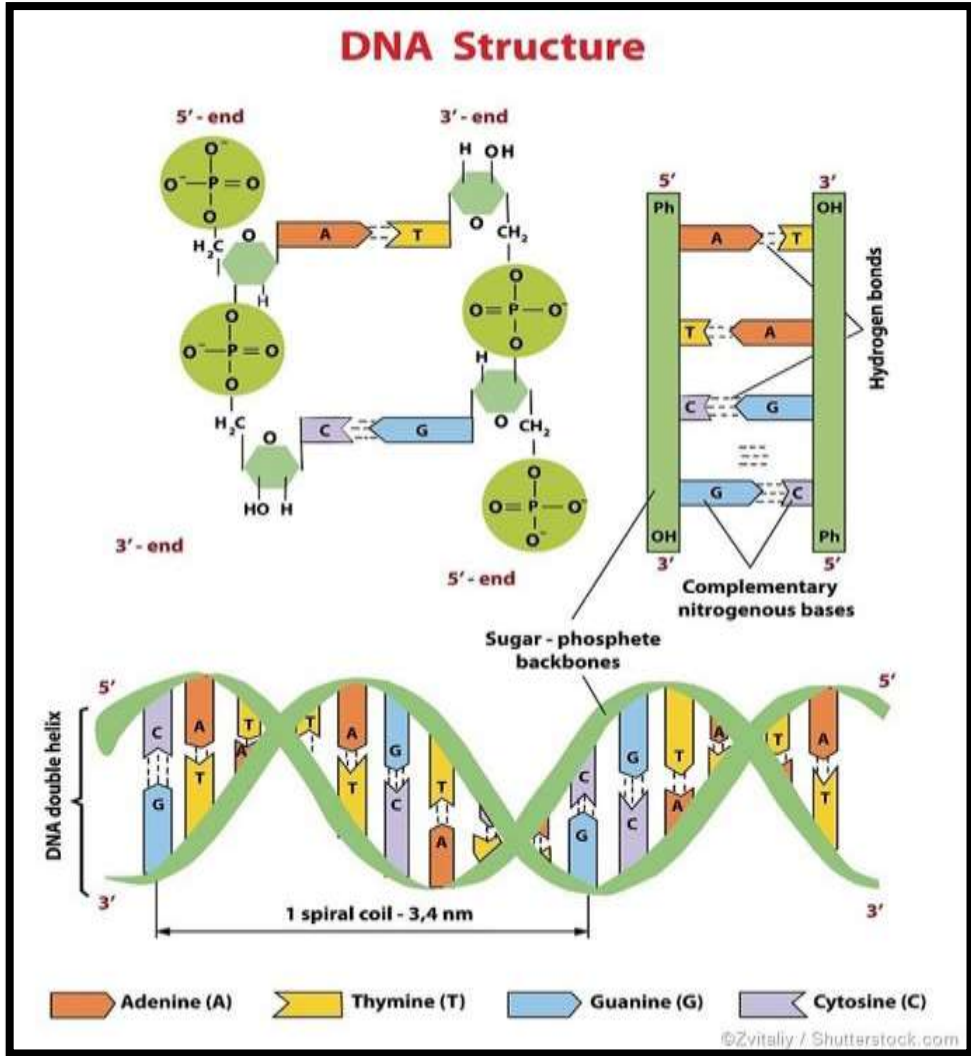
• تركيب النوكليوتيدات



ترتبط النوكليوتيدات ببعضها البعض عن طريق اواصر تساهمية تسمى اواصر الفوسفوديستر Phosphodiester bond . اما الحامض النووي يتكون من خيطين من

النوكليوتيدات التي يتم ربطها ببعضها بواسطة اواصر هيدروجينية. كما في الشكل (2-12)

- يقترن الأدينين دائماً مع الثيامين بواسطة أصرتين هيدروجينية .
- يقترن السيتوسين دائماً مع الكوانين بثلاثة اواصر هيدروجينية .



الشكل (2-12): تركيب DNA

❖ الحمض النووي الريبوي (RNA)

يشبه الحمض النووي الريبوي DNA كيميائياً. عادة ما يكون خيطاً واحداً فقط ويتم

استبدال Uracil U بـ T (Thymin)

❖ البروتينات

مركبات متعددة الببتيدات مؤلفة من سلسلة من الاحماض امينية (ترتبط مع بعضها بواسطة رابطة ببتيدية . رغم وجود عدد كبير من الاحماض الامينية في الطبيعة الا أن السلاسل البروتينية لا تحتوي سوى 20 نوعا منها فقط . تقوم البروتينات بكل الوظائف الأساسية للخلية :

✓ بناء الهياكل الخلوية.

✓ هضم العناصر الغذائية.

✓ وظائف التمثيل الغذائي .

التشخيص الجزيئي Molecular Diagnostics :

يعتمد التشخيص الجزيئي على دراسة وتحليل الجينات البشرية حتى نتمكن من فهم الأمراض بشكل أفضل ،مثلا من هو الأكثر عرضة للإصابة وأفضل الطرق للسيطرة عليها أو علاجها.

الاجهزة والمعدات مطلوبة في مختبر التشخيص الجزيئي :

هناك اجهزة ومعدات محددة مطلوبة في مختبر التشخيص الجزيئي من أجل تحليل الاخطاء المحتملة في تسلسل الشفرات الجينية . Table (1-1)

1. ثلاجة Refrigerator :

الثلاجات ضرورية لتخزين المواد الكيميائية ومنتجات PCR (تفاعل البلمرة المتسلسل) بمتوسط درجة حرارة 4°C . يستخدم PCR لتحليل التعبير الجيني ، والاستنساخ ، والتسلسل ، والطفرات ، والتنميط الجيني.

2. الفريزر Freezer :

تستخدم المجمدات لتخزين المزارع النسيجية والعينات التي تحتاج الى تجميد . يمكنك الحصول على وحدة تجميع ثلاجة / مجمد أو شرائها بشكل منفصل حسب المساحة المتوفرة لديك والمساحة اللازمة لتخزين العينات. يجب أن تتراوح درجة الحرارة من 20°C إلى -80°C .

3. الرجاج Vortex Mixer : يستخدم الرجاج لخلط المكونات السائلة في الأنابيب

مثل خلط القوارير الصغيرة وإعادة تعليق الخلايا . عادة ما يتم تصميم هذه الخلاطات مع أوضاع اللمس أو التحكم الإلكتروني في السرعة لسرعات ثابتة .

4. جهاز الطرد المركزي Centrifuge :

يجب أن يحتوي مختبر التشخيص الجزيئي أيضًا على جهاز طرد مركزي مبرد بحد أدنى 5000 دورة في الدقيقة وجهاز طرد مركزي غير مبرد حسب درجة الحرارة

المطلوبة. تستخدم أجهزة الطرد المركزي لفصل المكونات على أساس الكثافة. هناك حاجة الى أجهزة الطرد المركزي الدقيقة. يجب أن يكون لها حد أدنى من 15000 دورة في الدقيقة لأنابيب 1.5 مل.

5. جهاز المدور الحراري Thermal Cycler

هناك حاجة إلى أجهزة تدوير حرارية من أجل دراسة تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR . يحتوي الجهاز على تدفئة وتبريد وأدوات تحكم دقيقة في درجة الحرارة تضمن توحيد درجة الحرارة. يقوم بتضخيم أجزاء من الحمض النووي من خلال تقنية PCR. يعتمد عمل هذا الجهاز على درجة الحرارة ممثلة بثلاث خطوات هي المسخ واعدة الارتباط والاستطالة **annealing and elongation, denaturation** .

6. المطياف الضوئي Spectrophotometer :

تحدد مقاييس الطيف الضوئي كمية الحمض النووي عن طريق قياس امتصاص الضوء أو كمية المواد الكيميائية في المحلول.

7. مُسلسِل الحمض النووي DNA Sequencer :

تُستخدم أجهزة التسلسل لتحديد التسلسل الجزيئي للحمض النووي . تُظهر الأنماط الناتجة لتسلسلات الحمض النووي كيف تؤثر الإنزيمات على الحمض النووي . يتم استخدام مُسلسل الحمض النووي لتحديد ترتيب القواعد النتروجينية (الكوانين و السيتوسين والأدينين و الثايمين) .

8. مجهر Microscope :

تستخدم المجاهر لرصد وتقييم العينات. يجب أن يكون المجهر مزودًا بنظام كاميرا لأرشفة نتائج الاختبار.

9. جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis System

هي الوحدة المستخدمة لفصل وتحديد عينات الجينوم ، اعتمادًا على الوزن الجزيئي والقطبية لهذه العينات. مكونات جهاز الترحيل الكهربائي هي : الشكل (3-12)

• خزان جل

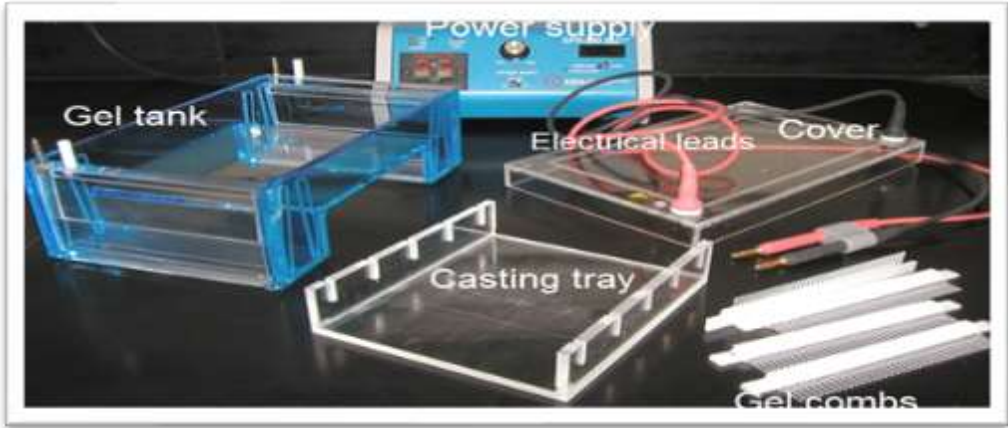
• صينية الصب

• أمشاط الجل

• الأسلاك الكهربائية

• التغطية

• مزود الطاقة



الشكل (12-3) مكونات جهاز الترحيل الكهربائي

10. الـAutoclave :

يستخدم في مختبرات التشخيص الجزيئي لتعقيم النفايات ومعدات المختبرات. يتم التعقيم باستخدام الحرارة لقتل البكتيريا والجراثيم.

11. حاضنة Incubator

تستخدم الحاضنات للحفاظ على الظروف المثلى مثل درجة الحرارة والرطوبة عند النمو. الحاضنات توفر البيئة المثالية.

12. مقياس درجة الحموضة pH Meter

مقياس الأس الهيدروجيني هي أدوات علمية تستخدم لقياس أيون الهيدروجين في المحاليل المائية . يقيس الحموضة أو القلوية.

13. المايكروتوم Microtome

يستخدم Microtomes للتقطيع النسيجي ، حيث ينتج شرائح رقيقة من أنسجة مختلفة تعرف بالمقاطع النسيجية .

14. حمام مائي Water Bath

يستخدم الحمام المائي في المختبرات لحفظ العينات في ماء محفوظ في درجة حرارة ثابتة.

مختبرات التشخيص الجزيئي لها تأثير كبير على علاج المرضى . ونتيجة لذلك ، يتم علاج الأمراض المعدية في وقت أسرع وبدقة أكبر. في هذه المختبرات ، تُستخدم هذه التقنيات لتحليل المعلومات البيولوجية من البروتينات والجينوم . يتضمن أيضًا معرفة كيفية تعبير الجيني لجينات داخل الخلايا لتصنيع البروتينات. في النهاية ، يتم التعرف على الأمراض من خلال دراسة الحمض النووي الدنا ، والحمض النووي الريبي الرنا ،

والبروتينات في السائل أو في الأنسجة. فعندما تكون الجزيئات والجينات والوظائف الخلوية غير طبيعية وتشير إلى أمراض معينة .

Table (12-1) : Molecular laboratory analysis and equipment :

N.	ANALYSIS/EQUIPMENT	Function
1	PCR Machine	Target gene amplification
2	Centrifuge	Separation of DNA/RNA at high speed
3	pH Meter	Measurement of acidity or alkalinity
4	Incubator for ever	used to grow and maintain microbiological cultures or cell cultures
5	Microwave oven	Sterilizing and dissolving agarose
6	Gel documentation	use for gel imaging and documentation of nucleic acid and protein suspended within polyacrylamide or agarose gels.
7	Refrigerated micro centrifuge	used to spin small (2 ml or less) liquid samples at high speeds.
8	Electrophoresis unit	For separation of DNA/RNA
9	Freezer	For storage of samples
10	-80C Freezer	For prolong storage and preservation of samples
11	Refrigerator	Use to keep sample preserved at low temperature

12	Water bath For incubation of	samples in water at a constant temperature over a long period of time
13	Hotplate with magnetic stirrer	keeps liquids circulating as they are heated for a faster and even reaction
14	Hybridization oven used on constant	rotating plates when probes were being used to identify proteins and for even distribution over the membranes, leading to a more reliable result.
15	ELISA Microplate Reader	Analyze enzyme kinetics, microbial growth and even cell based assays base on the absorbance of the wavelength

Buffers that used in molecular biology lab :

المحلول المنظم Buffer Solution : المحلول المكون من مزيج لحامض ضعيف وأحد أملاحه أو مزيج من قاعدة ضعيفة وأحد أملاحها ويمتاز بان له القدرة على مقاومة التغيرات في الرقم الهيدروجيني pH عند إضافة كميات قليلة من الحامض أو القاعدة عليه.

بعض المحاليل المنظمة المستخدمة في مختبر الجزيئي البيولوجي :

- TE buffers: include TAE (Tris acetate EDTA) and TBE (Tris borate EDTA) .
- PBS buffer: phosphate buffered saline
- Tris- HCl buffer
- Phosphate buffer
- DNA/RNA modifying enzyme buffer
- PCR enzyme buffers
- Restriction enzyme buffers

- ACD: Acid citrate dextrose (anticoagulant agent)
- PBS: phosphate buffer saline with 7.4 PH
- Extraction solution : made of (Tris, EDTA, SDS)
- Tris (keep the nucleic acid with pH at 7.8-8.3).
- EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid): is used as chelating agent that bind to Mg^{++} ions that necessary for nucleases.
- SDS: used as detergent (dissolves the proteins and phospholipids in cell membrane.
- Proteinase k: digest proteins.
- Phenol chloroform : separate the sample in the tube into two phases; aqueous phase (contains DNA) and organic phase.
- Ethanol: used for washing the DNA
- TE solution: keep the DNA in $-20C^{\circ}$

التقنيات البيولوجية الجزيئية الشائعة :

بعض تقنيات البيولوجيا الجزيئية الأكثر استخدامًا :

1. **الترحيل الكهربائي Electrophoresis** : عملية فصل الجزيئات، مثل الـ (DNA) والبروتينات عن بعضها تبعًا لحجمها ، وتُعتبر دعامة أساسية في مختبرات البيولوجيا الجزيئية. يمكن استخدامه لتحديد الجزيئات أو أجزاء الجزيئات، وللتحقق من أن الجزيئة المُتناولة هي الصحيحة والمطلوبة.
2. **Polymerase Chain Reaction (PCR)** : هي عملية تُستخدم لتضخيم عينات صغيرة جدًا من الـ (DNA) لكميات يمكن استخدامها في تجارب لاحقة، وتُعتبر أداة أساسية في البيولوجيا الجزيئية للتأكد من وجود كمية كافية من الـ (DNA) لإنجاز تقنيات لاحقة، كالتعديل الجيني، بالإضافة إلى امتلاكها استخدامات عملية أوسع كما في الطب الشرعي (تحديد الهوية بواسطة الـ (DNA) وتشخيص الأمراض
3. **Restriction Digest** : عملية قطع الـ (DNA) لأجزاء صغيرة باستخدام إنزيمات فعالة restriction enzyme على تتابع جيني محدد فقط .
4. **Ligation** : عملية ربط قطعتي (DNA) مع بعضهما، وتُعتبر مفيدة عند إضافة قطعة جديدة من هذا الحمض النووي لجينوم آخر.

طرق تحطيم الخلايا : Methods of Cell Breaking

هناك العديد من التقنيات التي تستخدم لتحطيم الخلايا من أجل استخلاص الجزيئات الحيوية المطلوبة الموجودة فيها وفيما يلي أهم هذه الطرق:

اولا : التقنيات الميكانيكية : Mechanical Techniques

1. تقنية السحق الآلي : Automated Milling Technique

في هذه التقنية يستخدم الهاون Mortar والمدقة (Pestle) لتحطيم الخلايا، توضع العينة المراد سحقها في الهاون ثم تضاف لها بعض المواد لتسهيل عملية سحقها ومنها مادة النيتروجين السائل التي تمتاز بأنها ذات درجة حرارة -176°C ، عند إضافتها إلى العينة وبعد السحق الجيد تتحول العينة إلى مسحوق Powder ، وفي حالة عدم توفر هذه المادة يمكن استخدام الرمل أو مسحوق الزجاج والذي يضاف بكميات مناسبة لكمية العينة المستخدمة. كما في الشكل (4-12)



الشكل (4-12) السحق الآلي (الهاون والمدقة)

2. تقنية استخدام المكسرات الميكانيكية : French Press Technique (Bead beating method)

تستخدم خرزات الزجاج أو السيراميك لكسر الخلايا المفتوحة ، وهذا النوع من التكسير الميكانيكي لطيف بما يكفي للحفاظ على العضيات سليمة. يمكن استخدامه مع جميع أنواع الخلايا ، ما عليك سوى إضافة حبات إلى كمية متساوية من خليط الخلية . تعتمد التقنية على تكسير الخلايا من خلال وضعها في محلول واستخدام الضغط والتفريغ في أجهزته ميكانيكية خاصة. الشكل (5-12)



الشكل (5-12) التكسير الميكانيكي

ثانيا : التقنيات الفيزيائية : **Physical Methods**

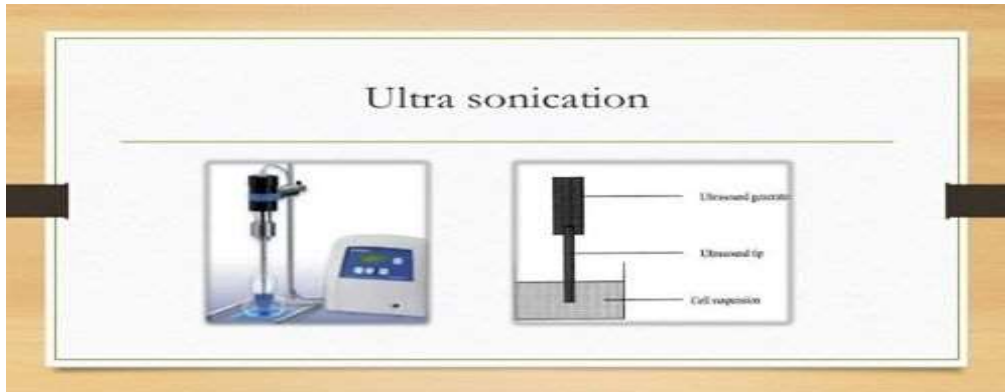
1. الموجات فوق الصوتية : **Sonication**

يتم تعريض الخلايا لموجات او ذبذبات فوق الصوتية او عالية التردد، تقسم الموجات الصوتية إلى:

- أ. موجات صوتية مسموعة تقع تردداتها بين 10000 – 16000 .
- ب . موجات فوق الصوتية Super Sound Waves وتقع تردداتها بين 16000 – 20000 .
- ج . الأمواج الفائقة Ultrasound Wave والتي تقع تردداتها فوق 20000 .

تكون الموجات الصوتية ضمن المدى المسموع غير مؤثرة على خلايا الأحياء المجهرية ، بينما تؤثر الترددات الفائقة على خلايا الأحياء المجهرية إذ تتسبب في تلف بعض الجزيئات الكبيرة مثل البروتين والأحماض النووية ، واستمرار هذه الترددات يؤدي إلى حدوث اهتزازات عنيفة لمكونات الخلية مما يدمر عضيات الخلية وبالتالي موتها. من مساوئ هذه الطريقة حصول تحطيم للمادة الوراثية والجزيئات البروتينية الكبيرة ولكن

هذه الطريقة مفيدة في استخلاص الأنزيمات والمكونات الداخلية على شرط التبريد ،لذا لا يجوز إطلاق الذبذبات إلا لفترة 40-20 ثانية والتوقف للتبريد ولمدة 6 - 3 مرات. كما في الشكل (6-12)



الشكل (6-12) الموجات فوق الصوتية

3- التجميد والإذابة : Freezing & Thawing

يؤدي تجميد الخلايا وإذابتها بسرعة لمرات متكررة إلى تحطم الأنسجة ولكن هذه الطريقة لهذا الكثير من المساوئ منها تستغرق وقتا طويلا جدا . تستخدم للطحالب والمواد النباتية اللينة.

4- درجات حرارة عالية : High temperatures

تؤدي درجات الحرارة المرتفعة والضغط إلى تكسير الروابط بين جدران الخلايا ، ولكنها أيضا تحطم البروتينات. على الرغم من أنها طريقة سريعة ، إلا أن الحرارة تسبب في تحطيم لكل الخلية .

ثالثا : التقنيات الكيميائية Chemical Techniques

تتضمن الطرق غير الميكانيكية إضافة الإنزيمات أو المواد الكيميائية التي تكسر مكونات جدار الخلية. غالبًا ما يتم استخدامها مع القوة الميكانيكية لضمان التمزق الكامل للخلية. عيب استخدامها هو أنه غالبًا صعوبة إزالتها من العينة بعد ذلك .

1-المواد الكيميائية : Chemical

يمكن للمذيبات العضوية مثل الكحولات أو الأثير أو الكلوروفورم أن تعطل جدار الخلية عن طريق نفاذية جدران الخلايا والأغشية. إنها مفيدة بشكل خاص إذا كنت ترغب في استخراج جزيئات كارهة للماء (مثل أصباغ النبات). غالبًا ما تستخدم في النباتات .

2- EDTA :

يمكن استخدامه على وجه التحديد لتعطيل جدران خلايا البكتيريا سالبة لصبغة جرام ، والتي تحتوي جدرانها الخلوية على عديدات السكاريد الدهنية التي يتم تثبيتها بواسطة كيتونات مثل Mg^{2+} و Ca^{2+} . حيث يعمل EDTA على مسك الكيتونات مما يترك ثقبًا في جدران الخلايا.

3- المنظفات : Detergents

يمكن تعريف المنظفات بأنها مركبات ذات نهايتين محبة وكارهة للماء تتداخل مع مكونات أغشية الخلية Lipoprotein وتخرقها مما يؤدي إلى تدميرها وبالتالي إلى النفاذية الكاملة لغشاء الخلية وخروج مكوناتها. يفضل عند استخدام المنظفات تدعيمها بمركب ال EDTA لغرض المحافظة على عضيات الخلية من التلف وأحيانًا يستخدم السكروز Sucrose .

هنالك ثلاث أنواع من المنظفات وهي :

أ- المنظفات السالبة Anion Detergents : مثل ال SDS

ب - المنظفات الموجبة Cation Detergents : مثل ال Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

ج- المنظفات المتعادلة Neutral detergent : مثل Triton X-100

4- المعالجة الحامضية أو القاعدية Acid or Base Treatments :

وهي محدودة الاستخدام مع الأنظمة الحيوية.

رابعاً : الطرائق البيولوجية Biological Methods :

1- استخدام الانزيمات الحالة Hydrolysis Enzymes ومنها استخدام أنزيم Lysozyme

2- العاثيات Phages يكون استخدامها محصور في مجال البحوث فقط.

3-المضادات الحيوية Antibiotics ومنها استخدام البنسلين Penicilin ومشتقاته لتحطيم كبسولة البكتيريا الضارية.

استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA extraction

يمكن استخلاص الحمض النووي من أي نسيج خلوي سليم تقريبًا:

- ✓ الجلد
- ✓ دم
- ✓ لعاب
- ✓ نطفة
- ✓ مخاط
- ✓ أنسجة عضلية
- ✓ نخاع العظم

يشكل الحامض النووي الدنا نسبة صغيرة من مكونات الخلية وعادة ما يوجد في أماكن محددة ومعروفة من الخلية. في الخلية بدائية النواة Prokaryotic cell يوجد الدنا بشكل مكثف ومتمركز في مكان يدعى المنطقة النووية Nucleoi والتي لا تنفصل عن بقية مكونات الخلية بغشاء خلوي. اما في الخلية حقيقية النواة Eukaryotic cell فيوجد الدنا في مكان محدد وهو النواة والتي تنفصل عن بقية اجزاء الخلية الاخرى بغشاء خلوي ، حوالي 90 % من الدنا يوجد في النواة ضمن الكروموسوم ويسمى الدنا النووي Nuclear DNA ، اما البقية فيوجد في الماييتوكوندريا ويسمى الدنا الماييتوكوندريا Mitochondrial DNA (mtDNA) وفي البلاستيدات الخضراء ويسمى الدنا البلاستيدات Chloroplast DNA . اما في الفيروسات فيوجد DNA محاط بالغلاف البروتيني ويشكل 30 - 50 % من الكتلة الكلية للفايروس . كمية الدنا الموجودة في الفايروس قليلة جدا بالمقارنة مع كمية الدنا الموجودة في الخلايا الحقيقية والبدائية النواة .

تعد عملية استخلاص الدنا من العمليات الضرورية للحصول على نموذج الدنا، " وأيا كان مصدر الاستخلاص (بكتريا ، خلايا نباتية ، خلايا حيوانية) فان عملية الاستخلاص تتضمن ازالة الشوائب للحصول على الدنا نقيا " . ان عملية استخلاص الدنا من الكائنات الحية مهمة جدا وتمثل الخطوة الأولى والأساسية للعديد من التجارب والفحوصات المختبرية الوراثية الاخرى . يمكن ان تعرف عملية الاستخلاص بشكل عام بأنها عملية الحصول على مادة محددة من المجموع الكلي للمواد الاخرى بواسطة التأثير الفيزيائي او الكيميائي . ان استخلاص الدنا في حالات كثيرة تمثل المطلب الاساسي للعديد من العمليات الجزيئية الاخرى .

الاهداف الرئيسية لاستخلاص DNA هي :

1- فصل DNA من كل مكونات الخلية الاخرى ضمن خطوات متسلسلة ويجب ان يكون هذا الدنا نقياً وبدون اي ملوثات من بروتينات او كربوهيدرات او RNA والخ . يمكن فصل الدنا عن المكونات الاخرى لان وزنه الجزيئي عالي مقارنة بالجزيئات الأخرى .

2- الحصول على تركيز او كمية كافية من DNA لإجراء التجارب الأخرى المطلوبة.

3- تحضير DNA ذو نقاوة عالية وخالي من الملوثات الاخرى.

4- تجهيز DNA ذو وزن جزيئي عالي (High molecular weight (HMW) وتسمى هذه العملية Integrity والذي يتراوح 50 to 200 kbp .

تعد مبادئ عزل واستخلاص الدنا من الكائنات الحية واحده لجميع الطرق لذلك فان جميع الطرق المستخدمة لاستخلاص الدنا تتضمن الخطوات الاربعة التالية :

1-تحضير المستخلص الخلوي (تكسير الخلايا) Preparation of cell (extract Cells breakage

تكسير الجدران والأغشية الخلوية لتسهيل خروج الدنا وبقيّة مكونات الخلية الأخرى ودون التعرض لأي أضرار أخرى . هناك العديد من الطرق المستخدمة في تكسير الجدران والأغشية الخلوية مثل الطحن grinding ، المزج او الخلط blending ، الضغط العالي high pressure كل هذه الطرق تسمى التكسير الميكانيكي والتي تعطي قوة عالية لتكسير الجدران أو الأغشية الخلوية.

تكسير الخلايا النباتية يتم باستخدام النتروجين السائل الذي يكون ذو درجة حرارة واطئة جدا 176 تحت الصفر مع الهاون mortar والذي توضع فيه العينة والمدقة او يد الهاون pestle والذي يستخدم للسحق . الخلايا الحيوانية فأنها تمزج او تفرم لزيادة المساحة السطحية . اما الخلايا البكتيرية فلا تحتاج لمثل هذه العمليات يتم تكسير الخلايا باستخدام الطرق الكيميائية المنظفات (detergents) او باستخدام الطرق الانزيمية . المنظفات تعمل على إذابة الليبيدات الموجودة في الاغشية الخلوية بالإضافة الى أنها تملك تأثير تثبيطي لأنزيمات DNases التي تعمل على تحليل ال DNA ويمكن ان تمسخ البروتينات وبذلك تساعد في ازالة البروتينات من المحلول . الاغشية الخلوية تحطم او تحلل باستخدام محلول الاستخلاص والذي يحتوي على EDTA و SDS في اغلب الاحيان . ال EDTA يعمل على ازالة ايونات Mg^{2+} والتي تمثل الدعامه الأساسية في حفظ التركيب الكلي للعشاء الخلوي . اما ال SDS فانه يساعد في تحطيم الأغشية الخلوية بإزالة الليبيدات من تلك الاغشية . الجدول (12-2)

2- تنقية الدنا من المستخلص الخلوي Purification of DNA from cell extract

بالإضافة الى DNA يحتوي محلول المستخلص الخلوي كميات من البروتينات والحمض النووي الرنا RNA لذلك يجب التخلص من هذه الملوثات للحصول على الدنا بشكل نقي عن طريق :

1- إزالة البروتينات Removal of Protein

يتم فصل الدنا عن المكونات الخلوية الأخرى باستخدام العديد من عمليات إزالة البروتينات والتي تسمى De-proteinization Process من خلال استخدام معاملات بروتينية وأنزيمية. يتم إزالة البروتينات من المحلول بالاعتماد على الصفات الفيزيائية للبروتينات والأحماض النووية والتي تمثل الاختلاف في عملية الذوبان، وهناك طريقتين لإزالة البروتينات من المحلول هي:

1-إزالة البروتينات باستخدام المذيبات العضوية Deproteinization using organic Solvents

معظم الطرق المستخدمة لإزالة البروتينات تعتمد على الاختلاف في ذوبانية الأحماض النووية والبروتينات المذيبات العضوية . الأحماض النووية جزيئات محبة للماء hydrophilic mole-cules وتذوب بسهولة ضمن المحلول (الطبقة) المائية ، أما البروتينات فأنها تحتوي على بقايا(جذور) كارهة للماء تجعلها تذوب في المذيب العضوي . أشهر المذيبات العضوية المستخدمة في إزالة البروتينات هي الفينول phenol والكلوروفورم chloroform المضاف اليه كمية قليلة isoamyl alcohol

الفينول مادة بلورية في درجة حرارة الغرفة يتحول الى سائل بإذابته في محلول-Tris HCL ذو اس هيدروجيني 8 . ان البروتينات تحتوي على بقايا(جذور) كثيرة كارهة للماء متمركزة في وسط الجزيئة ، وجزيئات الفينول من ناحية أخرى كارهة جدا للماء عليه عندما يتم مزج محلول المستخلص الخلوي مع حجم مماثل من محلول الفينول فان بعض جزيئات الفينول تميل الى الذوبان في لب (وسط ، مركز) جزيئة البروتين بدلا ذوبانها في الماء وبالتالي تنتشر جزيئة الفينول في وسط جزيئة البروتين وأخيرا تجعلها تنتفخ ثم تنفجر او تمسخ denature . جزيئات البروتين الممسوخة تذاب ضمن طبقة الفينول أما جزيئات الأحماض النووية والتي لا تملك الجزيئات الكارهة للماء فإنها تبقى ضمن الطبقة المائية العلوية.ضمن هذه المرحلة لايسطيع الفينول إزالة كل البروتينات من المحلول وعليه تكرر عملية الاستخلاص بالفينول مرة ثانية لإزالة كل البروتينات الموجودة ضمن المحلول .مع كل مرحلة استخلاص يتم فقدان حوالي 20 % من جزيئات الدنا وبما ان الفينول مادة سامة Toxic وعملية تحضيره مزعجة لأنه ذو رائحة كريهة لذلك يفضل استخدام الطرق الانزيمية في إزالة البروتينات.

أما الكلوروفورم فانه لا يذوب في الماء ولا تفقد جزيئات الدنا حتى عندما تعداد عملية الاستخلاص به عدة مرات. فعالية الكلوروفورم في إزالة البروتينات The

chloroform deproteinization action of مسخ البروتينات وجعلها تدخل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء the water chloroform interphase ونتيجة لذلك يرتفع تركيز البروتينات ضمن الطبقة الوسطى مما يؤدي الى ترسيبها . بما ان فعالية الكلوروفورم في إزالة البروتينات تحصل ضمن الطبقة الوسطى المتكونة بينه وبين الماء لذلك فان فعالية الكلوروفورم تزداد بزيادة المساحة السطحية، لانجاز ذلك يتكون اولا "شكل مستحلب من الكلوروفورم والماء، ونظرا " لان الكلوروفورم لا يستطيع الاختلاط او الامتزاج مع الماء بالشكل الاعتيادي لذلك يتم التحريك (الاهتزاز) القوي vigorous shaking للمزيج لإنجاز ذلك، وفي بعض الاحيان يضاف ال isoamyl alcohol ليساعد في تكوين المستحلب وزيادة المساحة السطحية للماء والكلوروفورم .

2- إزالة البروتينات باستخدام الأنزيمات Enzymes Deproteinization

يمكن ان تزال البروتينات من مزيج المستخلص الخلوي باستخدام الانزيمات والتي من اكثرها استخداما "ال pronase ، proteinase K ، كلا الأنزيمين ثابت جدا وتستخلص من الفطريات بشكل طبيعي ويمكن ان تحضر بشكل صناعي وتمتاز بكونها خالية من انزيمات DNase ولكن تكون غالية الثمن . هذه الانزيمات تكون فعالة جدا بوجود تراكيز واطئة من المنظفات السالبة anionic detergent وتراكيز عالية من الاملاح وال EDTA ومدى واسع من الاس الهيدروجيني pH (6.0-10.0) ودرجة الحرارة المثلى لها (50-67°C) لذلك تستطيع ان تحطم البروتينات بدون ان تحتاج الى عوامل مساعدة. المشكلة في استخدام هذه الانزيمات انها تستطيع ان تزيل 80 % من البروتينات الموجودة وهذا يعود الى ان تحطيم البروتينات يعتمد على تركيز الانزيم والمادة الاساس . عمليا "معدل ازالة البروتينات the deproteinization rate يعتمد فقط على تركيز المادة الاساس (substrate) للأنزيم بسبب انه ليس عمليا "ان تضاف كمية كبيرة من الانزيم لتسريع التفاعل عند تركيز منخفض من المادة الاساس، وكأي تفاعل كيميائي فان تركيز المادة الاساس يقل كلما تقدم وقت التفاعل، لمعالجة هذا التباطؤ ولإكمال الانزيم عمله الى نهاية الوقت المحدد يتم استخدام تركيز عالي من الانزيم والمادة الاساس حيث ان الانزيم يستطيع ازالة 80 - 90 % من البروتينات ضمن الوقت المعقول . هذه المشكلة يمكن ان تعالج باستخدام احد المذيبات العضوية في الاستخلاص ولمرة واحدة فقط .

2- إزالة الحامض النووي RNA Removal of RNA

ازالة الحامض النووي RNA خلال عملية استخلاص الدنا باستخدام الانزيمات ولكن هذه الانزيمات لا تزيل كل RNA الموجود ولذلك نلاحظ بقاء كمية قليلة منه مع الحامض النووي DNA. من افضل وارخص الانزيمات المستخدمة لهذا الغرض هي 1 ribonuclease A and ribonuclease T والتي تستطيع ان تحطم جزيئة RNA وخاصة عند القاعدة السايروسين C و اليوراسيل U بعد استخدام المذيبات العضوية او الانزيمات في تحطيم البروتينات وازالة الحامض النووي RNA يتم ترسيب

البروتينات الممسوخة باستخدام الترسيب الميكانيكي (الطرد المركزي Centrifugation) والذي يتم إجراؤه بعد التحضين في الحمام المائي Water Bath مباشرة "او احيانا" يسبق عملية الطرد المركزي اضافة محلول بيروكسيد الصوديوم ذو التركيز العالي (5 - 6 مولاري) حيث يؤدي ذلك الى ترسيب البروتينات وبقية المكونات الخلوية ضمن الطبقة السفلى (الأثقل) اما الدنا فيبقى ضمن الطبقة المائية بشكل ذائب ويحتاج الى عملية ترسيب.

ترسيب الحامض النووي الدنا : precipitation of the DNA

يتم ترسيب الدنا الموجود ضمن الطبقة المائية بتركيزه (تجميعه) باستخدام نوعين رئيسيين من الكحول وهما الايثانول ethanol والايذوبروبانول isopropanol .

جزيئات الماء القطبية Polar تحيط بجزيئات الدنا في المحلول المائي aqueous solution عملية ذوبان الدنا في الماء تحصل عن طريق تفاعل قوي بين الشحنة السالبة لمجموعة الفوسفات لجزيئة الدنا مع الشحنة الموجبة لجزيئة الماء مما يؤدي الى ذوبان الدنا في الماء. ترسيب الدنا بالكحول يعتمد على اساس تقليل ذوبانية الدنا في الماء ، حيث يتم اضافة الكحول الى المحلول المائي والذي يعمل على تجميع خيوط الدنا ضمن المحلول المائي بسحب جزيئات الماء منها . بعدها يتم سحب خيوط الدنا المتجمعة والتي عادة " تكون باللون الابيض باستخدام Hook باستخدام عملية الطرد المركزي لترسيب خيوط الدنا في اسفل انبوبة الاختبار.

عندها يتم اضافة محلول ethanol 70% بمقدار 2 مل الى الدنا المترسب وتحريكه بهدوء لغرض غسل الدنا وازالة بقية الاملاح المترسبة معه . بعد ذلك نرسب الدنا من هذا المحلول باستخدام عملية الطرد المركزي وتترك انبوبة الاختبار مفتوحة لمدة نصف ساعة لتجف خيوط الدنا بشكل تام وتتطاير بقايا جزيئات الايثانول.

اخيرا "يتم اذابة الدنا المترسب بإضافة محلول TE او الماء المقطر وبمقدار 100µL - 500 حسب كمية الدنا المترسب ثم يترك المحلول الاخير الى اليوم التالي بدرجة حرارة الغرفة لغرض ذوبان الدنا ضمن المحلول بشكل تام ويفضل التحريك Shaking اذا توفر ذلك.

4 . تقدير تركيز ونقاوة الدنا : Determination of the Purity and Quantity of DNA

المرحلة الأخيرة في اي عملية استخلاص للأحماض النووية DNA ، RNA هي تقييم النتيجة، بالنسبة للدنا يتضمن ذلك تقدير نقاوة وتركيزه . يتم تقدير تركيز ونقاوة الاحماض النووية باستخدام التقدير الطيفي باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer System تستعمل طريقة الامتصاص عند الطول الموجي 260 nm لقياس كمية الدنا او الرنا او كليهما في محاليلها وهي طريقة سريعة وسهلة ودقيقة لقياس كمية الأحماض النووية.

تستعمل كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية) Optical Density عند الطول الموجي 260 nm لقياس كمية الدنا لان الحامض النووي الدنا يملك اعلى امتصاص للكثافة الضوئية عند هذا الطول الموجي واقل امتصاص عند الطول الموجي 230 nm. اما كمية الامتصاص عند الطول الموجي 280 nm فتستخدم لتقدير كمية البروتينات الموجودة ضمن محلول الدنا. ان كثافة ضوئية قدرها 1 تقابل 50 مايكروغرام من الدنا لكل 1 مل (50µg \ml) بينما تقابل (40µg \ ml) للحامض النووي . تتصف المحاليل النقية للدنا او للرنا بقيمة الكثافة الضوئية للطولين الموجيين 260 مقسومة على 280 وهي 1.8 للدنا و 2 للرنا وتقل القيمة في حالة وجود ملوثات لنموذج الحامض النووي كالبروتينات وغيره

الجدول (2-12): وظيفة المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة في استخلاص الأحماض النووية :

No	المادة او المحلول	الوظيفة
1	EDTA	يعمل على تحليل جدار الخلية من خلال قيامه بسحب ايونات المغنسيوم الموجبة Mg^{++} التي تحافظ على استقراره جدران وأغشية الخلايا
2	Tris – HCl	يحافظ على استقراره ال pH المحلول
3	Isopropanol	يقوم بترسيب الدنا عن طريق سحب جزيئات الماء المرتبطة مع الدنا، يضاف بحجم مماثل لحجم المحلول الذائب فيه الدنا
4	Ethidium bromide	صبغة لهذا قابلية التألق عند التعرض لاشعة فوق بنفسجية ولها القابلية على الارتباط مع الحامض النووي المزدوج DNA
5	RNase	أنزيم يقوم بتحليل جزيئات الحامض النووي الرنا RNA
6	DNase	أنزيم يقوم بتحليل جزيئات الحامض النووي الرنا DNA
7	Ethanol 70 %	يقوم بغسل جزيئات الدنا من خلال إزالة بقايا الأملاح المستخدمة في الاستخلاص.
8	Ethanol 100%	يقوم بسحب جزيئات الدنا المرتبطة مع جزيئة الدنا مما يؤدي ذلك الى تحويل الدنا من الشكل الذائب الى الشكل الغير ذائب وبالتالي ترسيبه
9	SDS	منظف ايوني سالب الشحنة Anion Detergent يقوم بمسح بروتينات الغشاء الخلوي ويعمل على فصل

		البروتينات المرتبطة مع جزيئة الدنا وتحليلها.
10	Sodium acetate	احد الأملاح التي تستخدم في ترسيب ألدنا لان هذا الملح سريع الذوبان في الايثانول 70 % مما يؤدي إلى إزالته بسهولة من ألدنا خلال الغسل مع الايثانول 70%
11	NaCl	يتأين إلى Na^+ و Cl^- -ايون الصوديوم الموجب الشحنة يرتبط مع ألدنا السالب الشحنة هذا يسمح لجزيئه الدنا لتترسب في الكحول بدون استخدام هذا الملح يبقى ألدنا سالب الشحنة وسوف يبقى في الطبقة المائية للمحلول
12	Chloroform	مذيب عضوي له صدفه القطبية (صفة القطبية للمذيب : هو المذيب الذي يعمل على توزيع المحتويات الخلوية بين طورين عضوي ومائي) عند اجراء عملية الطرد المركزي Centrifugation تتوزع الدهون والبروتينات وبقية المحتويات الخلوية في طو بيني Interphas أما الأحماض النووية فإنها تتواجد ضمن الطبقة المائية لقابليتها للذوبان في الماء.
13	Phenol	مذيب عضوي يقوم بمسخ البروتينات، جزيئة البروتين تحتوي على بقايا كارهة للماء التي تتمركز في مركز الجزيئة، عندما يمزج المحلول الحاوي على البروتينات الذائبة مع الفينول، جزيئات الفينول تنتشر في مركز جزيئة البروتين مما يؤدي الى انتفاخها وأخيرا مسخها.
14	Isoamyl Alcohol	يمنع تكوين الرغوة عند استخدام الكلوروفورم ويساعد على زيادة المساحة السطحية للكلوروفورم لإزالة البروتينات
15	Proteinase K	أنزيم يعمل على تحطيم بروتينات الغشاء الخلوي يستخدم بكثرة مع الخلايا الحيوانية والبكتريا السالبة الشحنة
16	Sodium Perchlorate	تزيل هذه المادة البروتينات الخلوية الناتجة من تحلل الأغشية الخلوية خلال الاستخلاص .تستخدم بتركيز عالي وتعمل على إزالة الـ SDS والبروتينات الذائبة وتمنع البروتينات للترسب مع الدنا خلال عملية ترسيبه بالايثانول
17	TE	لإذابة الـ DNA ، لتثبيط بقايا أنزيم الـ DNase إن وجدت
18	Ethanol	يقوم بترسيب الـ DNA عن طريق سحب جزيئات الماء

	100%	وبالتالي تحويل ال DNA من الشكل الذائب الى الشكل الغير ذائب مما يؤدي الى ترسيبه
19	Ethanol 70%	لغسل عينة ال DNA من خلال إزالة بقايا الأملاح والشوائب الأخرى.
20	Liquid Nitrogen	يعمل على تحطيم جدران الخلايا النباتية لأنه ذو درجة حرارة 176 تحت الصفر
21	Mgcl2	يحافظ على الأحماض النووية من تأثير الأنزيمات الحالة مثل أنزيم Lysozyme
22	Triton – X 100	احد أنواع المنظفات المتعادلة Neutral detergent التي تقوم بإذابة البروتينات بدون مسخها
24	Lysozyme	أنزيم يستخدم مع ال EDTA حيث يقوم بتكسير الجدار الخلوي او بتحليل الغشاء الخلوي للبكتريا.

الترحيل الكهربائي للدنا في هلام الاكاروز Agarose Gel :
Electrophoresis of DNA يمثل الفصل باستعمال الترحيل الكهربائي في الهلام احد أكثر التقنيات البسيطة والمهمة في فصل وتنقية DNA و RNA . الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis طريقة قياسية سريعة وبسيطة لفصل وتشخيص وتنقية قطع الدنا خلال مرورها ضمن الهلام وتستخدم :

1. فصل مزيج من قطع DNA ، RNA ، البروتين .

2. لحساب الوزن الجزيئي للجزيئات المفصولة من الهلام مقارنة مع مؤشر Marker ذو وزن جزيئي معلوم.

أنواع الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي في Types of Gel Using in Gel Electrophoresis :

1- هلام الأكاروز (AGE) Agarose Gel Electrophoresis : إن هلام الاكاروز المستخدم بشكل واسع في هذه التقنية عبارة عن سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الكالكتوز ومشتقاته والمرتبطة مع بعضها بأواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة Complex Net تعتمد فتحاتها Pores على تركيز الاكاروز فكلما كان التركيز عاليا كلما كانت الفتحات اصغر والعكس صحيح ، يتضح من ذلك ان قابلية الهلام على فصل القطع تعتمد على تركيزه فكلما زاد التركيز كلما زادت قابلية الفصل . إن تركيز هلام الاكاروز يتراوح بين 0.5 – 2 % وبطول 12 سم ، والأكثر

استخداما هو 0.7 - 1 % والذي يستخدم لفصل قطع دنا كبيرة الوزن الجزيئي .
200bp – 20Kbp

2- هلام اكريل اميد متعدد (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (PAGE)

هو عبارة عن ناتج ارتباط مادة الاكريل اميد المتبلورة مع مادة بز- اكريل اميد Bis-acrylamide لتكوين شبكة معقدة ذات ثقب اصغر قطرا من تلك الموجودة في هلام الاكاروز، ولهذا السبب فان هلام اكريل اميد متعدد أكثر ملائمة في فصل قطع الدنا الأصغر والتي تتراوح بين 1 – 200 bp ، ويكون التركيز الأفضل للاكريل اميد متعدد هو 7.5 % ولكن من مساوئ هذا النوع من الهلام (الطريقة) انه أصعب وذو كلفة عالية بالمقارنة مع الاكاروز .

هلام الأكاروز: Agarose Gel Electrophoresis (AGE)

ان مبدأ هذه العملية يعتمد على مرور الجزيئات خلال وسط (حقل) كهربائي مجهز بالشحنات السالبة من احد الأطراف وبالشحنات الموجبة من الطرف الآخر وبذلك سوف تحصل حركة دائرية للشحنات الكهربائية ، بما ان جزيئة الدنا تملك الشحنة السالبة نتيجة لوجود مجموعة الفوسفات لذلك يجب ان تكون الحفر Wells التي ستوضع بها عينة الدنا من جهة القطب السالب لكي تتحرك جزيئة الدنا باتجاه القطب الموجب نتيجة لانجذاب الشحنات السالبة نحو الموجبة مما يؤدي الى انفصالها حسب الوزن الجزيئي .

سوف نتناول بالتفصيل الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز وكما يأتي:

اولا :المواد والأجهزة المطلوبة Materials & Equipments Required : الجدول (12-3)

الجدول (12-3) : الاجهزة والأدوات المطلوبة لهذه التقنية تشمل الآتي:

Equipment	اسم الجهاز	
Balance	الميزان	1.
Microwave	الميكروويف	2.
Power Supply	مجهز القدرة	3.
Electrophoresis Tank	خزان الترحيل الكهربائي	4.
Tray of Gel	صينية(حوض)صب الهلام	5.
UV Transilluminator	جهاز الأشعة فوق البنفسجية	6.

7.	الـة تصوير رقمية	Digital Camera
8.	المشط	Comb
9.	البوصلة	Compass
10.	فيلم البارافين البلاستيكي	Para film
11.	الشريط الورقي اللاصق	Tape
12.	المقص	Scissors
13.	الماصة الدقيقة	Micropipette
14.	نهايات الماصات الالكترونية	Tips

المواد والمحاليل الكيميائية:

اما المواد والمحاليل الكيميائية المطلوبة فتشمل:

1- الاكاروز : Agaros

2- دارئ الترحيل الكهربائي : Electrophoresis Buffer

والذي يسمى محلول TBE (Tris Borate EDTA) بقوة X10 ويتكون هذا المحلول من:

- 0.89 مولار Tris-base
- 0.89 مولار Boric acid
- 0.02 مولار EDTA pH 8

يحضر 200 مل من محلول TBE 10X وذلك بأخذ 21.6 غم من Tris-base مع 11غم من حامض البوريك و إذابتها في 160 مل ماء مقطر ، ثم إضافة 10 من محلول Na_2EDTA بتركيز 0.4 مولار ويتم ضبط ال pH الى 7.8 بعدها أكمل الحجم إلى 200 مل بالماء المقطر ثم عقم بالمؤسدة عند كل استخدام يتم تخفيفه بإضافة تسعة أجزاء ماء مقطر للحصول على TBE X1

3- محلول التحميل بقوة X10 Loading buffer

يحضر من إذابة 0.25 غم من صبغة البروموفينول الزرقاء في 50 % كليسيرول وأضيف محلول EDTA بتركيز 60 ملي مولار ذو pH 8.0 وأكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر وتم حفظه على درجة 4 م.

4- صبغة بروميد الإثيديوم Ethidium bromide

تم تحضيرها بتركيز 10 ملغم/مل وذلك بإذابة 100 ملغم من مسحوق الصبغة في 10 مل من الماء المقطر وحفظت في قنينة معقمة في درجة حرارة 4 م لحين الاستعمال .
وحينها تمت إضافة 40 مايكروليتر/لتر من الماء المقطر.

ثانيا: العوامل المؤثرة على هجرة الدنا خلال هلام الاكاروز- :

يتعمد جريان الدنا عبر الاكاروز في مجال كهربائي من القطب السالب الى القطب الموجب على عوامل كثيرة منها :

- 1- **الوزن الجزيئي للدنا:** يعتمد جريان جزيئات الدنا على اوزانها الجزيئية، فجزيئات الدنا قد تكون خطية (مستقيمة Linear) مفردة او مزدوجة او على شكل حلزون وهي بذلك تختلف في البنية والوزن الجزيئي .تهاجر جزيئات الدنا بسرعة تتناسب تناسبا "عكسيا "مع لو غرتم 10 لوزنها الجزيئي.
- 2- **الشكل البنائي للدنا :** تختلف أشكال الدنا البنائية في سرعة جريانها في هلام الاكاروز .الشكل الدائري المغلق Closed Circular والشكل الدائري المشروخ Nicked Circular والشكل المستقيم Linear ذوات الأوزان الجزيئية المتشابهة تهاجر في تركيز معين من هلام الاكاروز بسرعات مختلفة.

3- كمية التيار الكهربائي:

تتناسب سرعة جريان جزيئات الدنا الخطية مع كمية الفولتية المستعملة للترحيل ومع زيادة كمية الفولتية الى درجة معينة فان جريان الجزيئات ذوات الاوزان الكبيرة ستزداد ولهذا فان قابلية الفصل بالاكاروز يمكن تقسيمها وتحسينها باستعمال تيار مقداره 5 فولت /سم.

4- المحتوى النوعي للقواعد في الدنا ودرجة الحرارة:

لا يتأثر الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بما يحتويه الدنا من قواعد نيتروجينية كما يحدث لو استعمل هلام الاكرلاميد ، كما ان تغير درجة الحرارة لا يؤثر في سرعة الترحيل .يستعمل الترحيل بوضع افقي عادة لفصل جزيئات الدنا بواسطة هلام الاكاروز مما يوفر قدرة في استعمال تراكيز واطئة للاكاروز في الفصل.

ثالثا : طريقة العمل Procedure :

1.تحضير الاكاروز:

يحضر الهلام حسب سعة الصينية Tray الموجودة في جهاز الترحيل الكهربائي، وعادة "يوزن 1 غم من الاكاروز ويوضع في ورق مخروطي ثم يضاف له 100 مل من دارى – Buffer Tris (TBE) EDTA – Borate المحضر مسبقا ، وتتم الإذابة بواسطة الحرارة ويفضل استخدام جهاز أُل Microwave ولمدة دقيقتين ، يتم ملاحظة المحلول المتكون يجب أن يكون صافي وذو لون مائي، يترك لفترة 3 - 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لتصل درجة حرارة المحلول إلى - 55 50 درجة مئوية.



Weighting.1



Buffering .2

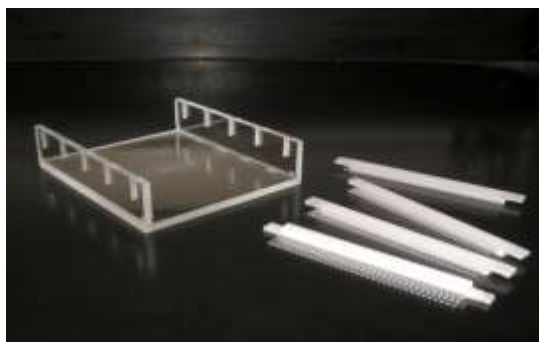




heating.3

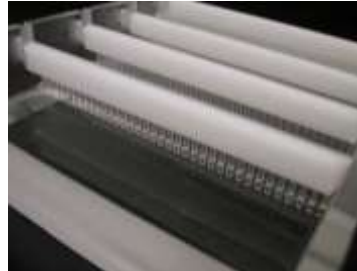
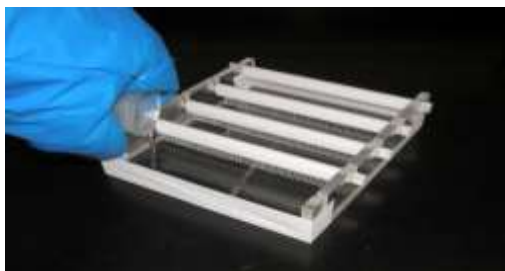
2- تحضير الصينية:

تحضر الصينية الحوض (بربط الأطراف بشكل جيد وتوضع على سطح مستوي (المنضدة) ويتم موازنتها باستخدام البوصلة بوضعها في وسط الصينية وبعدها يوضع المشط Comb في احد أطراف الصينية وفي بعض الاحيان يستخدم اكثر من مشط في نفس الوقت.



3- صب الهلام :

يصب الهلام في الصينية بهدوء ومن احد الأطراف لمنع تكون الفقاعات في الهلام وفي حال تكون الفقاعات يتم ازلتها مباشرة بواسطة نهاية ال Tip معقم ويترك ليتصلب، بعدما يتصلب يتم رفع المشط برفق وبطريقة عمودية.

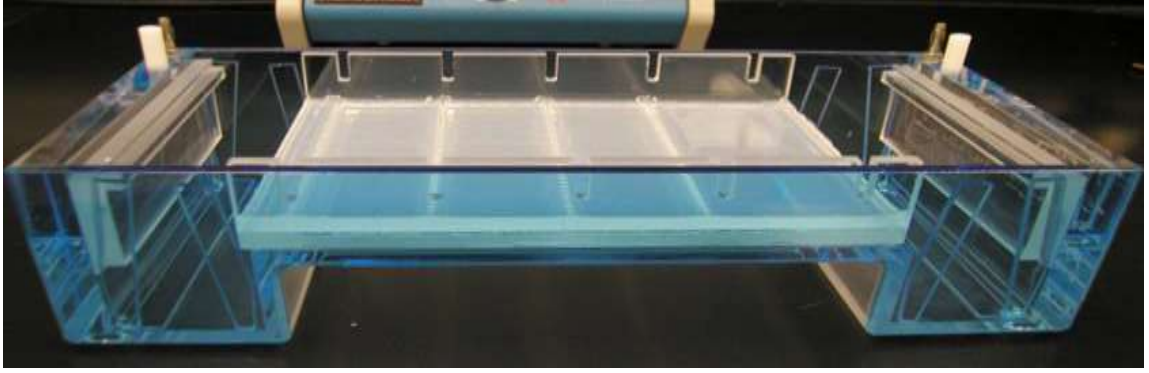


4- تحضير الخزان:

يوضع الخزان Tank على مكان مستوي ويتم موازنته بنفس طريقة موازنة حوض صب الهلام، يحتوي الخزان على قاعدة وسطية لوضع الحوض الحاوي على الهلام عليها، يملا الخزان بدارئ TBE بحيث يغمر الهلام بالمحلول، يزود الخزان بغطاء والذي تربط معه الأقطاب السالبة والموجبة من جانب ومن الجانب الآخر تربط الأقطاب مع جهاز القدرة Power Supply .

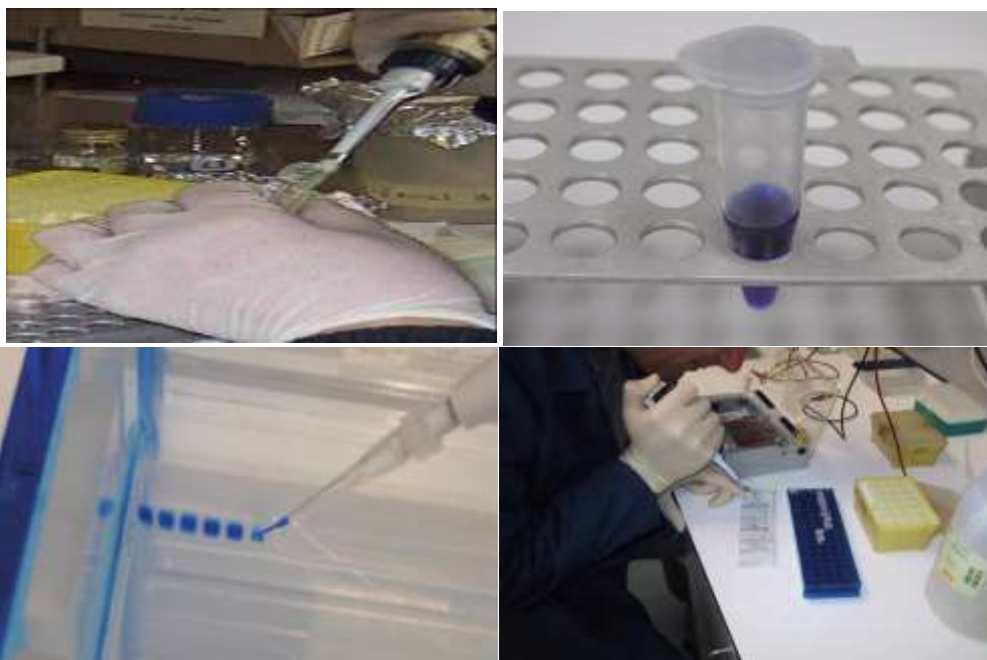
5-وضع الهلام داخل الخزان:

يوضع الحوض الحاوي على الهلام في الخزان في موقعه على أن يغطي محلول TBE الهلام ويجب ان تكون الحفر من جهة القطب السالب.



6-تحضير نموذج الدنا :

1. نأخذ قطعة من ال Para film وتوضع على سطح المنضدة وتثبت من أطرافها باستخدام الشريط الورقي اللاصق.
2. يضاف دارئ التحميل Loading Buffer إلى ال Para film وبنسبة 7 حجم من الدارئ إلى 3 حجم من الدنا لكل عينة وتخلط بشكل جيد باستخدام ال Tip المرتبط بالماصة الدقيقة Micropipette .
3. يسحب المزيج بالكامل باستخدام نفس ال Tip وينقل الى الحفرة الموجودة في الهلام، مع مراعاة إعداد خريطة توضح مكان وضع العينات في الحفر لضمان عدم نسيان أماكن العينات.



7-تشغيل الجهاز:

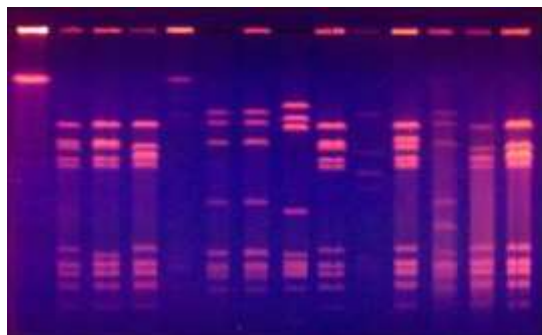
- 1- يوضع غطاء الخزان بالشكل الصحيح لضمان الترحيل من القطب السالب الى القطب الموجب ويتم تشغيل مجهر القدرة Power Supply على فولتية 45 V وامبيرية 180 Mili-amber ولمدة 15 دقيقة كمرحلة اولى.
- 2- بعد انتهاء ال 15 دقيقة نسمع صوت المنبه من مجهر القدرة ، نعدل الفولتية الى 80 V وامبيرية 180 Mili-amber ولمدة ساعة.
- 3- يتم مراقبة سير الترحيل من خلال حركة صبغة ال Bromophenol blue كمؤشر Indicator .



8.تصبغ الهلام:

- 1- بعد انتهاء وقت الترحيل الثاني يتم إطفاء مجهر القدرة أولا "ويرفع الغطاء بهدوء ثم يرفع الحوض الحاوي على الهلام برفق وينقل إلى حوض اخر يحتوي

- على صبغة ال Ethidium Bromide حيث يوضع الهلام داخل حوض صبغة برفق لضمان عدم تكسر قطعة الهلام ولمدة ساعة والحذر عند التعامل مع هذه الصبغة بارتداء القفازات السميكة لكونها مادة مسرطنة . Carcinogenic ان فائدة هذه الصبغة تتمثل في قدرتها على الارتباط بجزيئة الدنا المزدوجة الخيط اكثر من ارتباطها بالجزيئة المفردة الخيط (الرنا)
- 2- بعد انتهاء وقت التصبغ ينقل الهلام برفق من حوض التصبغ إلى مسرح Stage جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV – Transilluminator ويوضع غطاء الجهاز ثم يشغل.
- 3- نتيجة لارتباط صبغة ال Ethidium Bromide مع جزيئات الدنا وقدرتها على التألق عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية نلاحظ وجود حزم بالون الوردي وهي حزم الدنا ، نقوم بالتقاط صورة للهلام باستخدام اي نوع من انواع الكاميرات لغرض توثيق هذه الصورة والاحتفاظ بها.



استخلاص الحمض النووي الريبي RNA EXTRACTION PROTOCOL من عينات الدم

الخطوة الاولى - : مرحلة تحطيم الجدر ان والاعشية الخلوية

- 1- في هذه الخطوة يتم خلط $200\mu\text{l}$ من العينة في انبوبة صغيرة سعة 1.5ml (معلمة) ويضاف لها $600\mu\text{l}$ من مادة الجينيزول (GENEzol) حيث تعمل

مادة الجينيزول على تحطيم الاغشية الخلوية وتحرير الاحماض النووية بالإضافة الى حفظها.

2- بعدها تخلط بجهاز vortex لمدة 10 ثواني وتحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة لا تقل عن 5 دقائق.

3- ثم توضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 1 دقيقة على سرعة 12000 rpm حيث يتم فصل الراسب الحاوي على بقايا الخلايا المتحطمة عن الراشح الحاوي على الاحماض النووية.

4- يتم سحب الراشح بحذر لأنبوبة صغيرة سعة 1.5ml جديدة ومعلمة بنفس رمز الانبوبة السابقة.

الخطوة الثانية : مرحلة ترسيب البروتينات

1- في هذه الخطوة يتم اضافة كحول الايثانول المطلق % 100 (الى الراشح المحضر بالخطوة الاولى وبحجم مساوي لحجم الراشح (مثلا: لو كان حجم الراشح 600µl يضاف له 600µl كحول مطلق) حيث يعمل الكحول على ترسيب جزيئات البروتينات.

2- بعدها تخلط جيدا بجهاز vortex لمدة 10 ثواني وتنقل مباشرة الى الكولومات (انبوب اسطواني + انبوب فلتر) حيث يتم الترشح بوضعها بجهاز الطرد المركزي لمدة 1 دقيقة على سرعة (12000 rpm) يتم ترشيح الخلط على مرحلتين).

الخطوة الثالثة : مرحلة الغسل والتجفيف والحفظ

1- في هذه الخطوة يتم استخدام محلولين الغرض منهما غسل كل الشوائب والعوالق وبقايا العينة وابقاء ال RNA فقط ملتصق بأنبوبة الفلتر.

2- حيث يتم اضافة 400µl من محلول pre-wash وترشح بجهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثانية وبسرعة 14000 rpm .

3- بعدها يضاف 600µl من محلول wash ويرشح بجهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثانية وبسرعة 14000rpm تكرر هذه الخطوة 3 مرات.

4- ثم تجفف الكولوم بوضعها بجهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق بسرعة 14000rpm .

5- بعدها يتم استبدال الانبوبة الاسطوانية(الكولوم) بأنبوبة صغيرة سعة 1.5ml ويضاف فوق الفلتر مباشرة وبحذر محلول البفر RNase free water (بحجم 30µl-50µl وتترك للتجفيف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 3 دقائق ثم توضع بجهاز الطرد المركزي لمدة 1 دقيقة بسرعة 14000rpm ثم يحفظ ال RNA الناتج بدرجة - 20 درجة مئوية لحين الاستخدام .

ملاحظات :

1- يتم التخلص من السائل المترشح في الخطوتين الثانية والثالثة.

2- استبدال الكولوم بعد كل خطوة لضمان دقة النتائج.

- 3- توجد خطوة اختيارية قبل مرحلة الغسل وهي خطوة تحليل ال DNA حيث يتم خلط انزيم DNase بحجم 5µl مع بفر بحجم 45µl وتوضع على العينات الملتصقة بالفلتر وتترك لمدة لا تقل عن 15 دقيقة ثم بعدها تبدأ مرحلة الغسل.
- 4- تكرر خطوة الغسل 3 مرات مع عينات الدم فقط اما بقية انواع العينات ف يكفي غسلها مرة واحدة او مرتين.
- 5- تعامل بقية انواع العينات بنفس الخطوات وتختلف فقط بطريقة تحضير العينة ما قبل الخطوة الاولى .

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction

هي طريقة مُستعملة حديثاً بشكل واسع في علم الأحياء الجزيئي، حيثُ تعمل على إنتاج سريع لمليارات النسخ من عينة خاصة للحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (دنا) ، مما يُمكن العلماء من أخذ عينة صغيرة جداً من الدنا وتضخيمها إلى كمية كبيرة تكفي لدراساتها بالتفصيل. اخترع تفاعل البوليمراز المتسلسل عام 1983 بواسطة العالم كاري موليس . يُعتبر هذا التفاعل أساساً للعديد من الفحوصات الجينية. باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل، يتم تضخيم نُسخ بكميات صغيرة جداً من الحمض النووي في تسلسلات أو دورات من تغيرات درجة الحرارة . يُعتبر تفاعل البوليمراز المتسلسل شائعاً حالياً ولا غنى عنه في كثير من الأحيان حيثُ يستخدم في المختبرات الطبية والبحوث الطبية الحيوية والطب الشرعي الجنائي .

مبدأ عمل تقنية تفاعل انزيم البلمرة التسلسلي

يمكن اعتبار تقنية PCR محاكاة مبسطة لعملية استنساخ الحمض النووي DNA أثناء الانقسام الخلوي داخل الجسم . تهدف تقنية PCR إلى تضخيم جزيئات قليلة من الحمض النووي DNA ، بعد استخلاصها من خلايا أو سوائل الجسم وبالتالي الحصول على كميات كبيرة منها يمكن إجراء التحليل عليها . ليتم هذا الانتساخ، لا بد من توفر مواد محددة :

متطلبات تقنية PCR

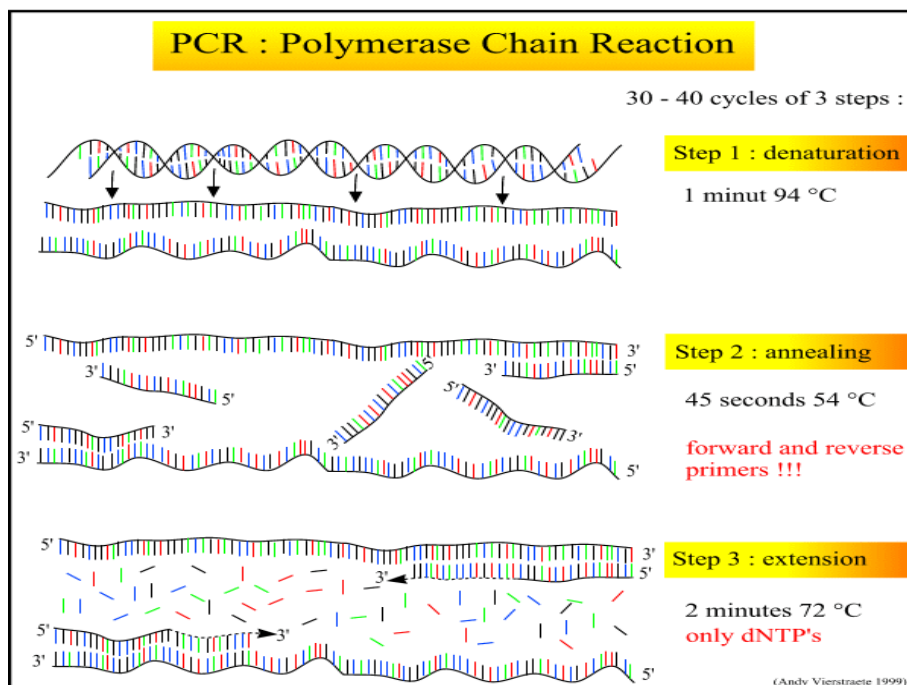
تتطلب العديد من الاجراءات والتي تكون مشابهة متطلبات مضاعفة DNA في خلايا الكائن الحي .

- 1- **القالب Template:** يتمثل في عينة DNA المراد تضخيمه وهذا التضخيم لا يشمل على القالب بأكمله وانما جزء منه وهذا يسمى بالجزء المستهدف .
- 2- **البادانات Primers :** نوعان : أمامي (Forward) وعكسي (Reverse) تتمثل بقطع صغيرة من DNA بشريط مفرد يكون مكمل في تتابعاته للقواعد النيتروجينية على طرفي الجزء المستهدف، وهي ضرورية لبدأ بتضاعف DNA . يتطلب تحضير Primer معرفة بعض تتابعات القواعد النيتروجينية

- على طرفي الجزء المستهدف من القالب . تتراوح اطوال Primer المستخدمة في PCR ما بين 20 – 30 قاعدة نيتروجينية .
- 3- انزيم **DNA polymerase** : وهو اساسي في هذه التقنية اذ يحفز عملية التضاعف وبالتالي عملية تضخيم DNA . لا يتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة. بعد انزيم Taq Polymerase المستخلص من بكتريا *Thermus aquacticus* من اكثر الانواع استخداما.
- 4- **النوكليوتيدات** : يتم تجهيزها على شكل نيوكليوسيدات ثلاثي الفوسفات منقوصة الاوكسجين (dNTPs (deoxynucleosides triphosphate) وبأنواعها الاربعة التي تدخل في بناء DNA
- 5- **المحاليل المنظمة وملح كلوريد المغنسيوم (MgCl₂)** : هناك العديد من المحاليل المستخدمة في هذه التقنية مع انزيم Taq Polymerase منها المحلول المنظم (Tris – HCl) .
- 6- **تقنية التفاعل المتسلسل** بأنزيم البلمرة تحتاج الى جهاز يقوم بتنظيم الحرارة وبرمجتها في ضوء مراحل التفاعل المختلفة وعبر كل دورة يسمى جهاز تفاعل البلمرة التأكسدي Thermocycler.

خطوات التفاعل

- 1- **المسخ Denaturation** : هي الخطوة الاولى التي يتم صهر جزيئة DNA اي فصل الاشرطة المزدوجة وابعادها عن بعضها وذلك برفع حرارة التفاعل الى 90 م او اكثر بقليل لحوالي دقيقة الى دقيقتين .
- 2- **ارتباط البودئ Annealing** : تتم بخفض درجة الحرارة الى 50 – 60 م تؤدي الى تكوين اواصر هيدروجينية بين البودئ وبين المتتابعات المكمل لها على اشرطة القالب .
- 3- **الاستطالة Extension** : تتم على درجة حرارة 72م وتعد هذه الدرجة مثالية لعمل انزيم البلمرة. تمتلك البودئ قوة جذب ايوني عالي تجاه DNA القالب اذا ترتبط البودئ بالمواقع الخاصة بها على القالب ويباشر انزيم البلمرة ببناء شريط جديد مكمل للقالب بإضافة القواعد النيتروجينية الى البودئ باتجاه 5 الى 3. وبانتهاء هذه المرحلة يتم الحصول على اعداد كبيرة من DNA قيد التضخيم. كما في الشكل (7-12)



الشكل (7-12): خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل

المصادر :

- Payne, D. A. (2016). Basics of Molecular Biology. In Molecular
- Pathology in Clinical Practice (pp. 1-17). Springer, Cham.
- Das, S., & Dash, H. R. (2015). Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems. Doi:10.1007/978-81-322-2095-4
- GENEzol™ TriRNA Pure Kit, cat# GZX100/D100 .
- قازانجي ، محمد عمر؛ جبر، حميد عبود. (2017). علم الحياة الجزيئي . الطبعة الاولى. جامعة بغداد، كلية الزراعة. الدار الجامعية للطباعة والنشر والترجمة.
- مصطفى، نشأت غالب. (2018) (البيولوجي الجزيئي. الطبعة الاولى . دار الكتاب الجامعي.



السيرة الذاتية والعلمية

نورس نجاح مبارك راضي
دكتوراه/ علوم بيولوجي / جزيئي
قسم تقنيات المختبرات الطبية / كلية الكوت الجامعة ،
واسط / العراق

المعلومات الشخصية			
• الاسم	نورس نجاح مبارك		
• المواليد	1989/4/24		
• مكان الولادة	واسط ، العراق		
• الجنس	انثى		
• الجنسية	عراقي		
• الحالة الزوجية	عزباء		
• رقم الهاتف الجوال	07803430882		
المعلومات الأكاديمية			
• اللقب العلمي	مدرس		
• القسم العلمي	قسم تقنيات المختبرات الطبية / كلية الكوت الجامعة		
• التخصص العام	علوم بايولوجي		
• التخصص الدقيق	جزيئي – مناعة		
• البريد الإلكتروني	nawras.najah@alkutcollege.edu.iq nawrasalmayahi@gmail.com		
• بوابة البحث العلمي	https://www.researchgate.net/profile/Nawras-Mubark		
• الباحث العلمي	https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57215900191 https://publons.com/researcher/5192238/nawras-najah-mubark/		
• ORCID	0000-0003-0369-854X		
التحصيل الدراسي			
الشهادة	السنة	التخصص	الجهة المانحة
• دكتوراه	2020	جزيئي / مناعة	كلية العلوم ، جامعة واسط ، العراق
• ماجستير	2016	وراثة جزيئية	كلية العلوم ، جامعة واسط ، العراق
• بكالوريوس	2009	علوم الحياة	كلية العلوم ، جامعة العراق ، العراق
الألقاب العلمية			
• مدرس مساعد	2017/7/29		
• مدرس	2020/11/1		