جامعة حماه – كلية الصيدلة **الجلسة العملية الأولى**

السنة الثالثة **أساسيات العمل في المخبر الجرثومي**

يعد التعامل مع الجراثيم والأحياء الدقيقة الأخرى خطراً كون أن هذه الأحياء متناهية في الصغر وتعد أكثر مسببات الأمراض انتشاراً، لذا فقد وجب التعامل معها بحذر شديد، كما أن التعامل معها يحتاج إلى هدوء ودقة وحذر، لذلك لا بدّ من أن تؤخذ بعض الشروط والاحتياطات بعين الاعتبار.

فالنظافة التامة أحد أهم الأسس في المختبر الجرثومي، إذ يجب العمل على طاولة ملساء مقاومة للحموض والأسس والحرارة، وتنظف كل يوم قبل البدء بالعمل وبعد الانتهاء منه وذلك بالماء المضاف إليه الماء جافيل أو أن تمسح بالكحول.

الأدوات المستخدمة :

1- **اللاقحة المعدنية Inoculation Loop / needle:** وهي عبارة عن قضيب معدني ينتهي بسلك من البلاتين الذي يسخن حتى الاحمرار بسرعة ويبرد بسرعة، أو من معدن آخر لا يتأكسد عند تسخينه. ومن اللواقح ما يكون فيها السلك البلاتيني مستقيم كالإبرة ويستعمل للزرع بالوخز وتسمى اللاقحة الإبرية Needle، أو أن يكون السلك البلاتيني منته بحلقة وتسمى باللاقحة ذات العقدة Loop. وتستعمل اللاقحة المعدنية لأخذ أجزاء من العينة المدروسة وزرع الجراثيم ونقلها.

2- **ممص باستور Pasteur Pipette:** ويحضر عادة من أنابيب زجاجية قطرها 6 مم تسد نهاياتها بالقطن وتعقم بالفرن بدرجة 180 مئوية مدة 30 دقيقة، ولصنعه نسخن هذه الأنابيب في منتصفها على لهب مصباح غاز حتى يحمر الزجاج، ونشد نهايتي الأنبوب فنحصل على أنبوب شعري بقطر 1 مم تقريباً ونحصل بذلك على ممصين شعريين.

3- **الماسحة القطنيةCotton Swap:** وهي عبارة عن سلك معدني أو عود خشبي يلف على أحد نهايتيه قطن، توضع في أنابيب اختبار وتسد بالقطن وتعقم لاستعمالها عند

Dr. Hiba Ahamed Al Dibi

الحاجة وذلك لأخذ عينات من اللوزتين والبلعوم والأغشية المخاطية، أو من الجروح والانتانات في جميع أنحاء البدن.

4- **مصباح غاز**: يجب أن يكون التعامل مع الأحياء الدقيقة دائماً بالقرب من اللهب، فالحرارة الصادرة عن هذا اللهب تضمن تعقيم المنطقة القريبة منه، كما يستعمل هذا اللهب لتعقيم الأدوات التي لا تتخرب بالحرارة كاللاقحة المعدنية مثلاً، ولكن يجب الانتباه أيضاً إلى عدم ملامسة اللهب لأي منطقة من جسم الإنسان، أو أن يوضع قريباً من المواد القابلة للاشتعال كالكحول.

ومن الأدوات الأساسية الأخرى للتعامل مع الأحياء الدقيقة نذكر: الصفائح والسواتر زجاجية، الأنابيب والأواني المعقمة، ملقط معدني، مكبرة لدراسة أشكال المستعمرات، مجهر لدراسة أشكال الجراثيم.

وكذلك يجب أن يحتوي المخبر الجرثومي على بعض الأجهزة الضرورية والهامة، مثل: جهاز الصاد الموصد Autoclave، فرن الحرارة الجافة Dry Heat Oven، الغرفة العقيمة Laminar Air Flow (L.A.F).

أنواع المجاهر المستخدمة في الفحص الجرثومي

1- المجهر الضوئي العادي Light Microscope:

يحتوي هذا المجهر على مجموعتين من العدسات (جسمية وعينية) تسمح بتكبير الجراثيم أو الأشياء الأخرى من 1000- 1500 مرة. ويستخدم فيه الضوء العادي أو مصباح كهربائي، فالضوء يمر عبر المكثف الذي يوجه الأشعة الضوئية لتمر خلال العينة المراد فحصها إلى العدسة الجسمية ومن ثم إلى العدسة العينية وأخيراً إلى عين المشاهد، ويحسب تكبير المجهر بحاصل ضرب قوة تكبير العدسة الجسمية المستخدمة بتكبير العدسة العينية المستخدمة أيضاً. وأغلب المجاهر تستخدم سلسلة من العدسات الجسمية بتكبيرات x 10، x 40، x 63، والعدسة الغاطسة بتكبير x 100، أما العدسات العينية المستخدمة فهي ذات تكبيرات x 10، x 15.

تلون العينات عادة للفحص المجهري، وبما أن فتحتها صغيرة لذلك توضع قطرة من زيت الأرز على سطح العينة الملونة المراد فحصها وتغطس فيها العدسة الجسمية (الغاطسة) لأن لزيت الأرز قرينة انكسار تساوي قرينة انكسار الزجاج مما يؤدي إلى مرور الأشعة بعد عبورها المحضر

Dr. Hiba Alhamed Albuihi

إلى العدسة الجسمية وعدم تبعثرها أو ضياعها وبالتالي يؤدي ذلك إلى زيادة وضوح العينة المفحوصة.

2 – المجهر المتباين الأطوار Phase Contrast microscopy:

يسمح هذا المجهر بدراسة الخلية الحية، ويختلف عن المجهر الضوئي بأنه مجهز بمكثف خاص يسمح بزيادة تباين قرائن الانكسار بين الخلية والوسط المحيط. ويستخدم هذا المجهر في دراسة حركة الجراثيم وتتبع نموها.

3 – المجهر ذو القعر المظلم Dark Field Microscopy:

الأشعة الضوئية في هذا المجهر لا تمر مباشرة عبر العينة حيث أضيف لمكثف المجهر أو أسفله قطعة موجهة تسمح للأشعة بالاصطدام بحواف العينة فالضوء المحيطي فقط يصل للعدسة الجسمية، فالعينة تبدو مضيئة على قعر مظلم. يستخدم هذا المجهر لفحص الأحياء الدقيقة التي لا ترى بشكل جيد وهي حية بالمجهر الضوئي العادي ولا يمكن تلوينها بالطرق المعروفة، أو أن خصائصها تتبدل عند تلوينها. وتفحص فيه عادة الأحياء الدقيقة العالقة في أوساط سائلة وتفحص فيه الجراثيم اللولبية الرفيعة مثل اللولبية الشاحبة *Treponema paladium* عامل مرض السفلس.

4– المجهر الضوئي المفلور Fluorescence Microscopy:

هذا المجهر يستخدم الأشعة فوق البنفسجية أو القريبة منها كمصدر ضوئي، إذ أن المواد المفلورة تتصف بإعطائها ضوءاً بلون واحد عندما يصطدم بها ضوء بلون آخر. فالأحياء الدقيقة تلون بمادة ملونة مفلورة وتفحص بهذا المجهر فتبدو بشكل ساطع لامع على قعر مظلم فمثلاً تستخدم مادة الاورامين Auramin O التي تظهر صفراء لامعة عندما تعرض للأشعة فوق البنفسجية تتلون بها عصية السل *Mycobacterium Tuberculosis* أما عصيات الجمرة الخبيثة *Bacillus Anthracis* فإنها تبدو بلون أخضر لامع إذا ما لونت بمادة مفلورة هي فلورسئين ايزوتيوسيانات Fluoresecein Isothiocyanate. كما ويستخدم هذا المجهر في الكشف عن الأضداد Antibodies.

Dr. Hiba Ahamed Albibi

5- المجهر الإلكتروني Electron Microscope:

هذا المجهر يعطي تكبيرات تفوق بكثير تكبيرات المجاهر التي ذكرناها سابقاً. ويستخدم هذا المجهر في الكشف عن الأجسام والكائنات الحية الدقيقة جداً كالفيروسات وعضيات الخلية. وفي هذا النوع من المجاهر تستخدم حزمة من الالكترونات بدلاً من الضوء المرئي، والعدسات المغناطيسية المستخدمة في المجهر الالكتروني تقابل العدسات العادية في المجهر الضوئي. ومن العقبات التي تعترض المجهر الالكتروني هي الحصول على شرائح رقيقة جداً من أجل فحصها كذلك دراسة العينات بأبعادها الثلاثة، وقد أمكن التغلب على ذلك باستعمال المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electron Microscope حيث يسمح هذا المجهر بدراسة بنية سطوح الخلايا والفيروسات.

Dr. Hiba Alhamed AlDuhi

2- التعقيم Sterilization

يعد التعقيم من أهم الأســس التي ترتكز عليها جميع العمليات الميكروبيولوجية لضــمان سلامة العاملين وكذلك نجاح العمل.

فالتعقيم هو إيقاف نشاط أو إبادة جميع أشكال وأنواع الأحياء الدقيقة التي قد تسبب تلوثاً للأدوات والأجهزة والأوســاط الغذائية المســتخدمة. وهذا يوجب بالضــرورة تهديم أنزيمات تلك الأحياء أو نواتجها الاستقلابية أو السمية.

ويجـب أن نفرق هنـا بين التعقيم Sterilization والتطهير Disinfection، لأن الأخير يعني تقليل العدد الكلي للجراثيم دون قتل أبواغها Spores، علماً بأننا غالباً ما نستعمل التعبيرين للغرض نفسه وخاصة عند وجود جراثيم غير متبوغة.

مقاومة الجراثيم للتعقيم Bacterial Resistance for Sterilization:

إذ تبدي الجراثيم ردة فعل للتعقيم تختلف باختلاف النوع الجرثومي، فمثلاً الجراثيم إيجابية الغرام +G أكثر تأثراً بالمطهرات من الجراثيم السلبية الغرام -G.

وبصورة عامة فإن الجراثيم الموجودة في أوساطها الطبيعية، تقاوم التعقيم أكثر من تلك الموجودة في الأوساط الصنعية، وكذلك فإن الأبواغ الجرثومية تبدي مقاومة أكبر من الخلايا الإعاشية.

– التأكد من التعقيم:

يوجد في الوقت الحالي عدة طرق للتأكد من سلامة وصحة عمليات التعقيم نذكر منها:

1 – بوساطة المشعرات اللونية والتي تعتمد على الكواشف اللونية الكيميائية وأهمها كربونات الرصاص وكبريتات أو كربونات الليثيوم.

2 – بوساطة المشعرات الحيوية Bioindicator:

وتعتمد على تعقيم مجموعة من السلالات الجرثومية المتبوغة والمحبة للحرارة Thermophilis Spores Froming Bacteria وتحضّن هذه الأبواغ مدة ثلاثة أيام، فإذا لم يحدث نمو فهذا دليل على جودة التعقيم أما إذا حصل نمو فهذا يعني أن عملية التعقيم كانت غير مجدية.

Dr. Hiba Ahmed AlDuhi

طرائق التعقيم:

يوجد عدة طرق للتعقيم أهمها:

A – التعقيم بالحرارة Sterilization by Heat:

1 – التعقيم بالحرارة الجافة Dry Heat:

وغالباً ما تستعمل بإحدى الطريقتين الآتيتين:

- التعقيم باللهب المباشر Direct Flame:

ويتم ذلك بإمرار إبرة التلقيح Inoculation Loop/Needle والصفائح الزجاجية وفوهات الأنابيب للمزارع الجرثومية في القسم العلوي من لهب مصباح البنزن مع تدويرها بحيث تمر جميع وجوهها عل اللهب من 3 – 4 مرات.

أما المشارط المعدنية فتعقم بغمسها في الكحول ثم بتعريضها على اللهب كالسابق.

- التعقيم بأفران الهواء الساخن Oven Dry Heat:

يستند مبدأ هذه الطريقة على رفع درجة حرارة الهواء الموجود داخل الأفران إما بالكهرباء أو الغاز وضبط هذه الدرجة بوساطة الترموستات، بحيث تبقى ثابتة على درجة حرارة معينة تتراوح بين 160 – 180 °م، تعقم بهذه الأفران جميع الأدوات المعدنية والزجاجية من أطباق بتري وماصات وغيرها، وذلك بعد وضعها في علب معدنية خاصة تسمى علب التعقيم أو لفها بالورق المقاوم للحرارة، ثم تحفظ العلب مغلقة بعد التعقيم لحين الاستعمال، هذا ويجب سد الأنابيب والدوارق والماصات بسدادات قطنية أو معدنية أو أغطية بلاستيكية جاهزة قبل تعقيمها.

2- التعقيم بالحرارة الرطبة Wet Heat Sterilization:

يتم بإحدى الطرق التالية:

- التعقيم بالبخار تحت الضغط Autoclaving:

ويستعمل لهذا الغرض جهاز الصاد الموصد Autoclave وهو عبارة عن أسطوانة معدنية متينة يوضع الماء داخلها كما توضع سلة معدنية لوضع الأدوات المراد تعقيمها. أما طريقة استخدام الجهاز فتكون بوضع المواد المراد تعقيمها بالسلة، ثم وضع كمية كافية من الماء المقطر حسب التعليمات الواردة مع الجهاز، يغلق الغطاء بإحكام ويفتح منفذ البخار ويسخن الجهاز حتى غليان الماء بداخله فنلاحظ خروج الهواء متقطعاً ثم ممزوجاً مع البخار، ثم البخار صافياً بشكل صفارة متواصلة، وعندئذ يقفل منفذ البخار ويبدأ الضغط بالارتفاع ومتى وصل مقياس الضغط

Dr. Hiba Ahmed Albishi

إلى الدرجة المطلوبة تخفف كمية الحرارة وترك الجهاز بتلك الدرجة مدة كافية، وهي تتراوح من 15 – 30 دقيقة بدرجة حرارة 121 °م وضغط 15 ليبرة/انش^2. يطفئ الجهاز بعدها وينتظر حتى انخفاض الحرارة والضغط إلى الصفر قبل فتح الجهاز.

يعد جهاز الصاد الموصد من أكثر أجهزة التعقيم بالحرارة الرطبة المستخدمة في مخابر الأحياء الدقيقة المتخصصة وذلك لتعقيم معظم الأوساط الغذائية الزرعية والسوائل التي تتخرب بدرجة حرارة عالية، كما يستعمل لتعقيم جميع المواد الزجاجية والمعدنية والمطاطية والورقية والمواد الغذائية كالمعلبات.

- **التندلة Tyndallisation:**

وهي التعقيم بالبخار المتقطع على درجة حرارة 100 °م. وذلك بتعريض الوسط إلى درجة حرارة 100 °م مدة ½ ساعة ثلاثة أيام متتالية. ففي اليوم الأول تقتل الخلايا الأعاشية وبعض الأبواغ، وفي اليوم الثاني تقتل الأبواغ التي نبتت وتحولت إلى خلايا أعاشية، واليوم الثالث للتأكد من تمام عملية التعقيم.

وتستعمل هذه الطريقة لتعقيم الأوساط التي تتغير خواصها الطبيعية عند تعرضها لدرجة حرارة أكثر من 100 °م كبعض الأمصال. ويستعمل الآن جهاز يدعى أرنولد Arnold وهو شبيه بالصاد الموصد لكن لا يسمح للحرارة بالازدياد أكثر من 100ْ م.

- **البسترة Pasteurisation:**

وهي التعقيم بالتسخين المتقطع على درجة حرارة 56 °م. إذ يتم تسخين الحمام المائي لدرجة 56 °م مدة ساعة وعلى مدار ثمانية أيام متتالية.

وتستعمل هذه الطريقة في تعقيم المواد التي تفسد بالحرارة المرتفعة، كالمصل الدموي الذي يتخثر بدرجة حرارة أعلى من 56 °م. وتعقم اللقاحات عند الدرجة 60ْ م مدة ساعة واحدة، بينما تعقم المواد الغذائية كاللبن والحليب بدرجة 75ْ م أو 85ْ م بإمرارها ضمن أجهزة خاصة مدة ½ ساعة.

– التعقيم بالأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Rays:

تستخدم لتعقيم المياه والهواء والسطوح وذلك لعدم قدرتها على اختراق السطوح الصلبة.

– التعقيم بالترشيح Filteration:

Dr. Hiba Ahmed Albuihi

يستعمل الترشيح لتعقيم السوائل الغذائية لتي قد تتغير صفاتها عند تعقيمها بالحرارة، كالصادات الحيوية ويتم ذلك بإمرار السوائل أو الهواء أحياناً في أجهزة الـ L.A.F أو في الغرف العقيمة خلال مرشحات ذات مسامات دقيقة حوالي 0.22 ميكرون تمنع الجراثيم من المرور خلالها.

كما يوجد عدد من طرائق التعقيم الكثيرة نذكر منها: التعقيم بالأشعة تحت الحمراء، والتعقيم بالغازات وأبخرتها كالأوزون، والتعقيم باستخدام بعض المواد الكيميائية كالكلوروفورم.

بعض قواعد العمل والأمان في المخبر الجرثومي

هناك بعض المخاطر الخاصة للعمل في المخبر الجرثومي تتجلى في أخطار التلوث وأخطار الحوادث، لذا يجب على العاملين في المخبر الجرثومي معرفة هذه المخاطر واتباع التعليمات الصحيحة والصحية لتجنب مثل هذه الحوادث أو الوقوع فيها.

1- الأخطار المرتبطة بالعينات المراد فحصها

الخطر الأساسي في هذا العمل هو تلوث العاملين بالمادة المراد فحصها، حيث إن بعض هذه الحوادث يمكن أن تكون الأساس في عدوى أو أخماج خطيرة تصنف كأمراض معدية مهنية. ويمكن أن تكون بعض الأنواع الجرثومية مسؤولة عن أخماج إثر أخطاء يمكن أن ترتكب أثناء العمل. ويحدث التلوث في أغلب الأحيان نتيجة لحركات مألوفة يتم القيام بها دون ملاحظتها.

ولتجنب هذه الحوادث يجب اتباع ما يلي :

- يجب أن يتم العمل في كافة مراحله بصورة عقيمة وفي مكان لا يحوي تيارات هوائية وبالقرب من مصباح كحولي إذ أن الهواء المحيط يحتوي على جراثيم، ولذلك يجب تجنب تسرب الجراثيم الخارجية إلى العينات المراد دراستها جرثومياً أو إلى الأوساط الزرعية بصورة تامة.
- عدم الأكل والتدخين في المخبر.
- استخدام الماصة الآلية أو اليدوية.
- عدم وجود جروح ظاهرة على أيدي العاملين في المخبر.
- يجب أن يغطى الرأس والأنف والفم بقناع قماشي.
- يجب أن يتم العمل في الحجرة العقيمة Laminair air flow واستخدام ماصات مجهزة

Dr. Hiba Ahamed AlDuhi

بإجاصة خاصة عند زراعة عينات مرضية تحتوي على عصيات السل.

- يجب أن يكون مكان العمل مغلقاً تماماً، وغالباً ما يكون جو المخبر ملوثاً ببعض الجراثيم والفطور التي يمكن أن تلوث المزارع الجرثومية، ولذلك نضطر إلى تنظيف مكان العمل بأكمله بالفورمول
- يمكن أن تكون جميع العينات المأخوذة من المرضى عوامل لنقل أمراض التهاب الكبد الفيروسية أو الايدز، لذا يجب التعامل معها بحذر شديد، كأن تسخن المصول على الدرجة 56 مئوية لمدة 30 دقيقة بعدئذ ترمى في وعاء يحتوي على ماء جافيل.
- يجب عدم لبس المجوهرات، لأنها يمكن أن يتجمع تحتها العديد من الجراثيم.
- يفضل استخدام قفازات ذات استخدام وحيد عند عزل العينات المراد تحليلها وأن يتم نزع القفازات بطريقة صحيحة، وأن تعامل هذه القفازات معاملة الأدوات الملوثة وتعقيمها قبل رميها.
- يجب أخذ الحيطة والحذر عند فتح الحبابات (الأمبولات) الحاوية على الأورمات الجرثومية المجفدة يجب أن ترمى المحاقن Seringes في أوعية قابلة للتعقيم وبدون أن تنزع الإبر منها، كما يجب إعادة وضع غطاء الإبرة ثانية.
- يجب مسح طاولة العمل قبل وبعد كل عملية زراعة باستخدام ماء جافيل.
- عدم ملامسة الوجه عن طريق الأيدي والأقلام... الخ، ويجب الحذر من ملامسة الوجه بأية أداة لامست طاولة العمل.
- يجب أن تكون جميع الأدوات في المخبر قابلة للتعقيم (أنابيب، حوامل، ...الخ).
- يجب تنظيف أرض المخبر وأن تطهر يومياً وبعد كل حادث.

Dr. Hiba Ahamed Albuihi