التقنيات الحياتية - اختياري

ا.م.د مرا أسامة احمد
ا.م.د عمر عبد العزيز احمد
م.د نوار طلال حامد

تحليل سائل النخاع الشوكي

Cerebrospinal fluid analysis

سائل النخاع الشوكي هو سائل مائي صاف عديم اللون يتدفق داخل وحول الدماغ والنخاع الشوكي. يحمي الدماغ والنخاع الشوكي ويساعد الجهاز العصبي المركزي على العمل بشكل صحيح عن طريق إزالة الفضلات من الدماغ.

تحليل سائل النخاع الشوكي (CSF) هو مجموعة من الفحوصات المخبرية التي تُجرى على عينة من السائل الشفاف الذي يحيط بالدماغ والحبل الشوكي. وهذا التحليل يساعد في تشخيص مشاكل الجهاز العصبي المركزي، مثل:

١. الالتهابات البكتيرية للسحايا (Septic Meningitis) .
٢. الأصابة الفيروسية للسحايا (Viral meningitis) .
٣. الأصابة ببكتريا السل (TB):
٤. الأمراض التنكسية في العمود الفقري.
٥. الأورام في الدماغ أو الحبل الشوكي.
٦. إصابات الرأس أو الحبل الشوكي.
٧. اضطرابات أخرى كالصرع أو الخرف

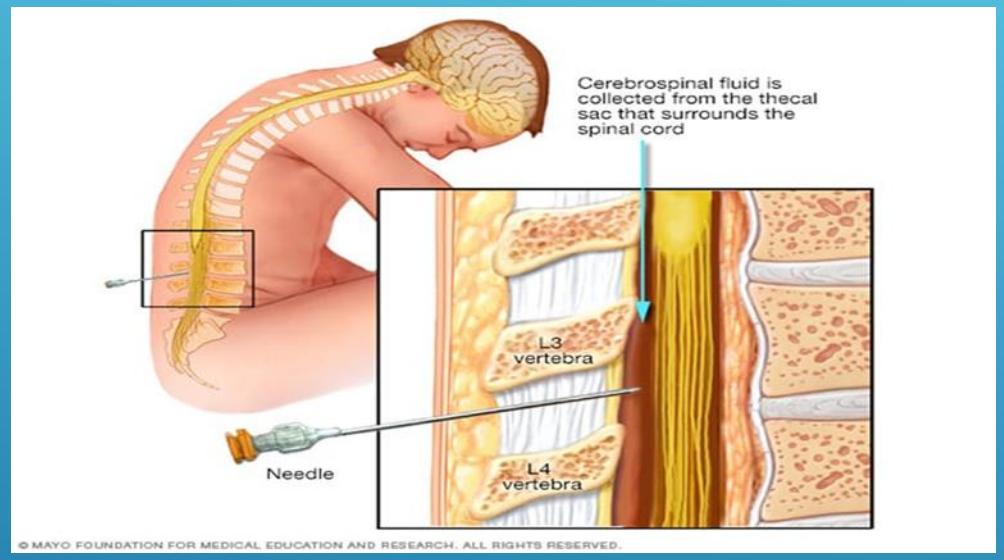
ينقسم تحليل (CSF) الى قسمين رئيسين هما:-

١. **الفحص الفيزيائي (Physical) ويشمل مايلي**

- اللون (Color): الطبيعي يكون شفاف (Colorless).
- القوام (Aspect): في الحالة الطبيعية يكون Clear.
- الضغط pressure :الطبيعي يكون بين 80 الى ١٢٠ mm

١. **فحص المكونات () Composition ويشمل مايلي:**

- Cl: الطبيعي 720 الى 750 mg/dl.
- السكر (Glucose): الطبيعي بين 40-80 mg/dl.
- البروتين(Protein): الطبيعي بين 20-40/mg/dl.
- الخلايا(Cells):الطبيعي بين 0-5



يتم سحب عينة السائل النخاعي عن طريق إجراء البزل القطني (البزل الشوكي) من منطقة أسفل الظهر .ويتم تحليل العينة في المختبر للكشف عن مؤشرات مثل المظهر، البروتين، خلايا الدم البيضاء، والسكر وغيرها

- القيمة الطبيعية لكريات الدم الحمراء في السائل النخاعي صفر، أي أنه لا توجد كريات الدم الحمراء في السائل النخاعي، وتجدر الإشارة أنه يدل وجود كريات الدم الحمراء في السائل النخاعي على وجود نزيف، أو تسرب الدم إلى عينة السائل النخاعي أثناء جمعها، و اصطدام البزل الشوكي مع الأوعية الدموية.

- **ضغط سائل(CSF) ، يُقاس ضغط تدفق سائل (CSF) بإرفاق مقياس ضغط مُعقّم مع الإبرة المُستخدمة في إجراء البزل الشوكي، ويدل زيادة الضغط على المشاكل المرَضية التي تزيد الضغط داخل الدماغ أو الجمجمة أو تعيق تدفق السائل الدماغي النخاعي مثل الأورام، واستسقاء الدماغ، والنزيف.**

- **اللون، يُشير اختلاف لون سائل (CSF) إلى وجود مشكلة مرَضية.**

- عدد خلايا الدم البيضاء(Cell counts) ، كريات الدم البيضاء توجد بكميات قليلة جداً يتراوح عددها من (٠-٥)، يشير ارتفاع عدد خلايا الدم البيضاء عامةً إلى الإصابة بالأورام السرطانية المنتشرة في الجسم، مثل اللوكيميا، أو إصابة رضية على الدماغ، ويدل ارتفاع عدد خلايا الدم البيضاء الليمفاوية (Lymphocyte) إلى وجود عدوى بكتيرية، أمّا العدلات (Neutrocyte) فتُشير إلى الإصابة بالتهاب السحايا الجرثومي، أو الخراج الدماغي، وحيدات النوى (Monocyte) تُشير إلى الإصابة بالتهاب السحايا الفيروسي، أو السل، أو التهاب الدماغ،
- الكلوكوز(Glucose) ، تُشير المستويات المنخفضة من الجلوكوز في عينة سائل (CSF) إلى العدوى البكتيرية، ويلزم عندها أخذ عينة دم للتأكُّد من مستويات السكر ومقارنتها أيضًا، ويُستحسن الحصول عليها قبل إجراء البزل الشوكي بنصف ساعة.

- البروتين(Protein) ، تُشير المستويات المرتفعة من البروتين إلى الإصابة بالأمراض التنكسية (وهي امراض تتراجع فيها وظيفة او بنية الأنسجة او الأعضاء المصابة وتسير نحو الأسوا مع مرور الوقت كالأورام الدماغية، وقد تدل على وجود مشكلة عصبية خطيرة، ، وقد يطلب الطبيب بعدها إجراء فحص الرحلان الكهربائي (CSF protein electrophoresis) المناعي لعينة سائل (CSF) لتحديد نوع البروتين المرتفع.

- فحوصات تراص اللاتكس(Latex agglutination) ، يُستخدم للحصول على تشخيص سريع بالتهاب السحايا الجرثومي الحاد، من خلال تحديد المُستضدات البكتيرية في عينة سائل(CSF) ، كما يُسهم في تحديد نوع البكتيريا المُسبّبة.
- صبغة كرام(Gram stain) ، يُستدَل من خلالها على نوع الكائن الحي المُسبّب للمرض الموجود في سائل (CSF) .
- زراعة سائل(CSF) ، تُستخدم للكشف عن نوع الكائن الحي المُسبّب للمرض من البكتيريا ، مثل بكتريا السل (Mycobacterium tuberculosis)، وبعض الفطريات وتحتاج من ٢٤ إلى ٧٢ ساعة لصدور النتيجة].

مثال:-

١	Colour	Turbid
٢	Glucose	5 mg/100 ml (45-80mg/dl)
٣	Cl	115 mmol\l (115-130 mmol\l)
٤	Protein	150 mg/100ml (115-130 mmol\l)
٥	Cells	300 (PNL)

يلاحظ من الفحص اعلاه انخفاض ملحوظ في السكر مع ارتفاع في الخلايا وهذا دليل على الأصابة البكتيرية للسحايا Septic Meningitis.

١	Colour	Clear
٢	Glucose	60 mg/100 ml (45-80mg/dl)
٣	Cl	125 mmol\l (115-130 mmol\l)
٤	Protein	40 mg/100ml (115-130 mmol\l)
٥	Cells	90 (Lymphocytis)

أعلاه يلاحظ ان السكر وال Cl ضمن الطبيعي لكن يوجد ارتفاع في عدد الخلايا اللمفاوية وهذا دليل على الإصابة الفيروسية للسحايا Viral meningitis.

وعند وجود انخفاض Cl وارتفاع في الخلايا (Cells) من النوع Lymphocytes هذا يدل على الأصابة ببكتريا السل (TB).

القدم السكري Diabetic Foot

هي مجموعة من التغيرات المرضية المؤثرة في الأطراف السفلية، والتي تنتج عادةً عن المضاعفات التي يسببها مرض السكري، مثل اعتلال الأعصاب الطرفية، وتلف الأوعية الدموية، وفقدان الإحساس بالقدمين.

يسبب ارتفاع سكر الدم وعدم السيطرة على مرض السكري لفترات طويلة حدوث تلف في الأعصاب الموجودة في القدمين وضعف في تدفق الدم، مما يسبب خدر وتنميل في القدمين، وعدم شعور المريض في حال إصابته بجرح أو إصابة في القدم، وبالتالي زيادة خطر إصابة قدم مريض السكري بالعدوى، والالتهابات، والتقرحات، ومضاعفات شديدة قد تؤدي إلى بتر القدم السكرية في حال عدم علاجها بشكل مبكر.

مراحل القدم السكري

يوجد عدة تصنيفات لمراحل القدم السكرية، والتي تهدف إلى تقييم حالة القدمين لمريض السكري وتقدير خطر الإصابة بالتقرحات، أو التهاب العظم، أو الغرغرينا، أو التعرض للبتر.

المرحلة : 0 قدم مريض السكري طبيعية والجلد سليم، ولا وجود لأي من عوامل الخطر الرئيسية.

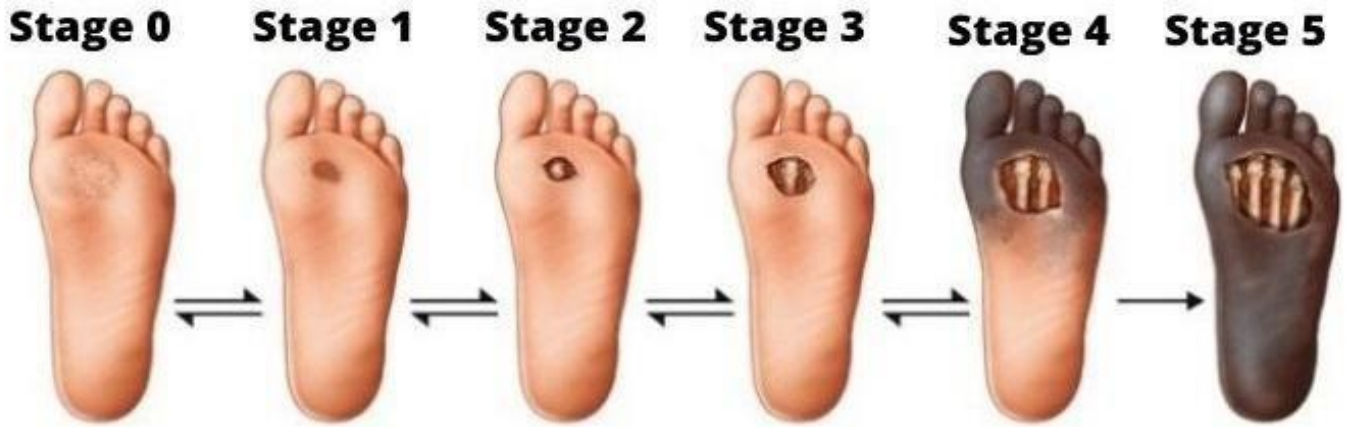
المرحلة : 1 قدم سكرية يوجد واحد أو أكثر من عوامل الخطورة، بالإضافة إلى زيادة في سماكة الجلد وتشكل قرحة سطحية أو جزئية.

المرحلة : 2 قدم سكرية متقرحة، وفي الغالب تتطور القرح في هذه المرحلة على السطح الأخمصي للقدم، وأصابع القدم، وحواف القدم.

المرحلة : 3 قدم سكرية ذات تقرحات عميقة وتطور التهاب في العظم.

المرحلة : 4 غرغرينا القدم الجزئية، وموت نسبة من أنسجة القدم.

المرحلة : 5 غرغرينا القدم الكاملة، ولا بد من إجراء البتر للقدم.



أسباب القدم السكري

يعتبر المسبب الأول للقدم السكري هو الارتفاع المزمن لمستوى السكر في الدم، مما يؤدي إلى مشاكل في الأطراف، وخاصة القدمين، ومضاعفات أخرى تؤدي في النهاية إلى الإصابة بالقدم السكري .ومن مضاعفات السكري التي تعد أسباب رئيسية للقدم السكري ما يلي:

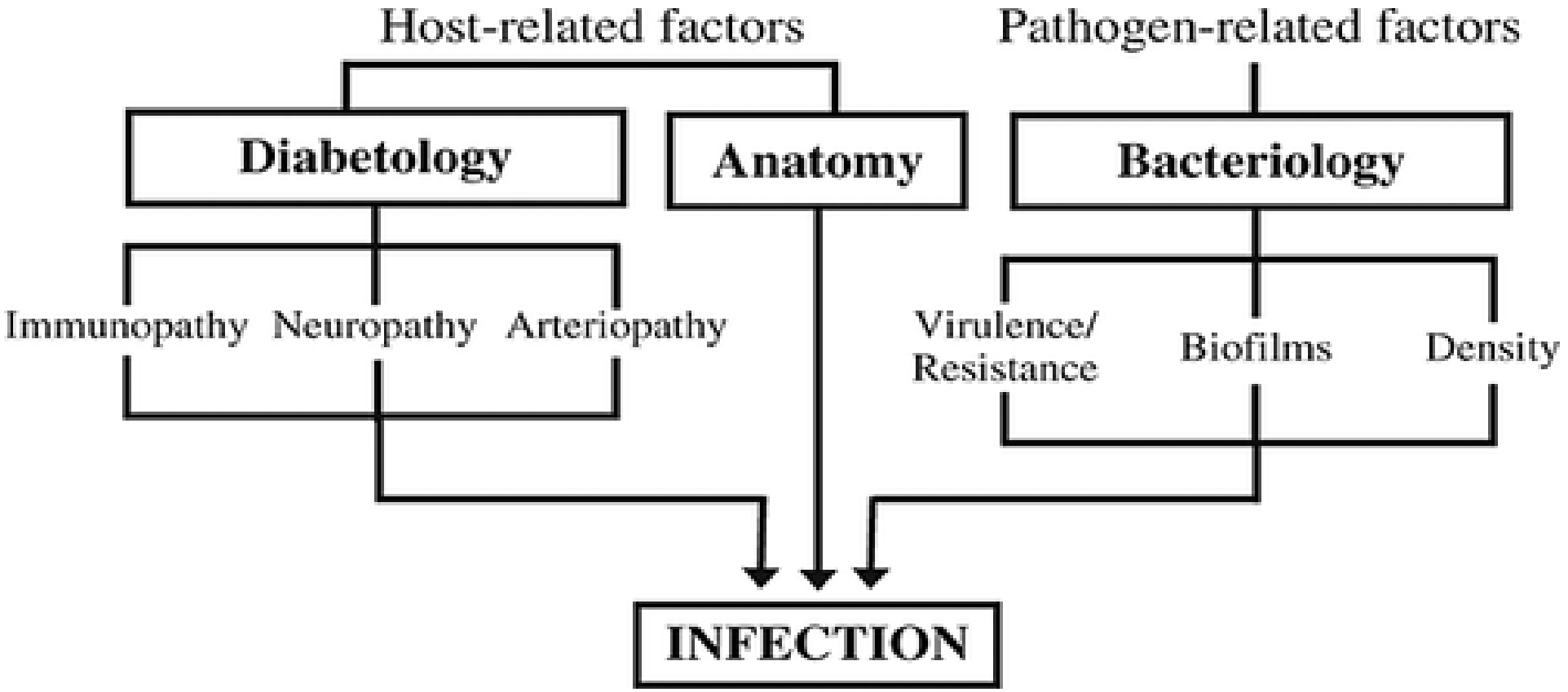
- اعتلال الاعصاب السكري
- ضعف المناعة
- أمراض الأوعية الدموية الطرفية
- الالتهابات الجرثومية التي تسبب قرحة القدم والتي ممكن ان تتطور الى حالة الغرغرينا والتي قد تسبب بتر الأطراف السفلية.

ان الفسلجة المرضية لإخماج قرحة القدم السكري Diabetic foot infection, DFI معقدة تماما , اذ ان انتشار الأخماج وشدتها يعتمد على نوعين من العوامل هما

1 – **العوامل المرتبطة بالمضيفHost related–factors**

2– العوامل المرتبطة بالممرض Pathogen related–factors

تشتمل الأولى منها على الاعتلال المناعي والعصبي وأمرا ض الشرايين فيما تشتمل الثانية على عوامل الضراوة ومقاومة الممرض للمضادات الحيوية والتنظيم المايكروبي كما هو موضح في المخطط



شكل يوضح التداخلات بين العوامل الأيضية والتشريحية والبكتريولوجية في اخماج القدم السكري

الأحياء المجهرية المسببة لخمج قرحة القدم السكري

ان تنوع الأحياء المجهرية في قرحة القدم يتأثر بعوامل عدة تشتمل على عمق الجرح والمناعة.

تحدث الإصابة الجرثومية بالقدم السكري بوساطة الجراثيم التي تنتشر في الانسجة الرخوة والعظم بعد اجتيازها الجلد الذي يعمل كحاجز وقائي وتدخل الى تحت العظم مما يؤدي الى نشر الإصابة الخطرة وتكوين القرحة التي تؤدي الى تأكل الأنسجة مسببة بتر القدم في العديد من الحالات نتيجة تأخر تشخيص وعلاج الحالات بصورة مبكرة.

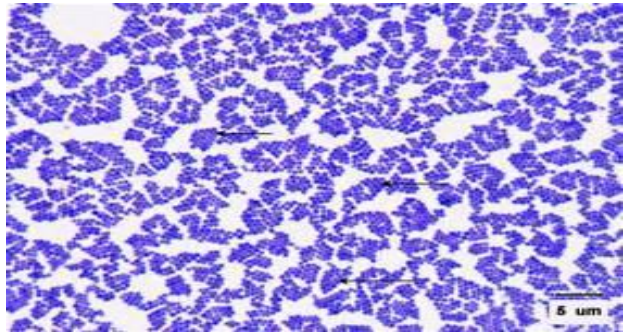
تعد المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية من اهم الأسباب التي تساهم في تطور القرح وصعوبة علاجها والوصول للحالة الحرجة للمرض.

تتصف أخماج قرحة القدم السكري بكونها متعددة الأحياء المجهريةpoly microbial وخليط من الأحياء الهوائية واللاهوائية mixed aerobic–anaerobicتتمثل البكتريا الشائعة بأجناس Staphylococcus و Streptococcus وأنواع من عائلة Enterobacteriaceae,Bacteroidesو Pseudomonas وأنواع Clostridium أما الفطريات الأكثر شيوعا في أخماج قرحة القدم السكري فتتمثل بجنس Candidaومن أهم أنواع البكتريا المسببة لخمج قرحة القدم السكري

Serial number	Bacteria	*n* (%)
	Gram-positive	
1	*Staphylococcus aureus*	18 (36)
2	*Streptococcus* species	2 (4)
	Gram-negative	
1	*Proteus* species	9 (18)
2	*Escherichia coli*	8 (16)
3	*Klebsiella* species	5 (10)
4	*Pseudomonas* species	4 (8)
5	*Citrobacter* species	3 (6)

أهم أنواع البكتريا المسببة لخمج قرحة القدم السكري :

المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*



صورة لبكتريا ***Staphylococcus aureus***

تتصف المكورات العنقودية الذهبية بكونها بكتريا كروية موجبة لصبغة كرام قطرها حوالي ١ مايكروميتر تقريبا تتجمع خلاياها بشكل يشبه عناقيد العنب بالنظر لحدوث انقسامها الخلوي في أكثر من مستو واحد وكثيرا ما تكون متعايشة في الجلد ، والغدد الجلدية والأغشية المخاطية ، وخاصة في انوف الأشخاص الأصحاءحيث ان مابين (٢٠-٣٠)% من عامة الناس هم حاملين لجـــــرثومة *S. aureus* كما تعد من الجراثيم الغير متحركة وغير المكونة للابواغ هوائية أختيارية ممكن ان تنمو على أوساط تحوي على نسبة عالية من كلوريد الصوديوم تصل الى ١٥% وباستطاعتها النمو بدرجة حرارة تتراوح ما بيـــــن ١٥-٤٥ °م ، وتصطبغ مستعمراتها ما بين اللون الابيض والرمادي او الرمادي او الابيض المصفر الى البرتقالي وتعطي تحلل من نوع β- hemolysis عند تنميتها على وسط اكار الـدم blood agar .

جنس *S. aureus* موجبة للكتاليز catalase والذي يميزها عن جنس *Streptocci* التي تكون سالبة للكتاليز. أمراضية جرثومة *S. aureus* تعود عموماً لقابليتها على أنتاج انزيم الـCoagulase والذي يجلط بلازما الدم ، تتميز بأيضها الذي يكون بالتنفس الهوائي او بالتخمر.

تُعد جرثومة *S. aureus* جزء من النبيت الطبيعي للجلد وتعد اكثر انواع المكورات العنقودية شيوعاً وامراضية حيث تتفاوت امراضيتها مابيـــــــن البســـــيطة والجـــهازية حيث اشارت العديد من الدراسات الى سيادة هذه الجرثومة في اخماج قرحة القدم السكري حيث تقوم هذه البكتريا بالألتصاق بالمضيف وافراز العديد من عوامل الضراوة التي تسهم في احداث المرض منها امتلاكها متعدد السكر الخارجيExopolysaccharide الذي يحميها من عملية البلعمة phagocytosis وانزيم مختثر البلازما الحر والمرتبط free and bound Coagulase كما ان لهذة الجرثومة القدرة على مقاومة المضادات التي تحتوي على حلقة β -lactam مثل البنسلينات والسيفالوسبورينات pinicillins and cephalosporin عبر شطر هذه الحلقة بانزيم B-lactamase التي تنتجها هذة الجرثومه .

١. الزائفة الزنجارية *Pseudomonas areuginosa*

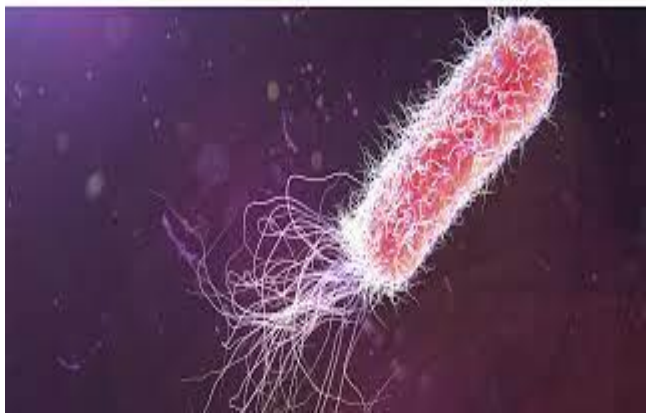
ينتمي جنس *Pseudomonas* الى عائلة *Pseudomonadaceae* وهي بكتريا هوائية متحركة سالبة لصبغة كرام ، تكون بشكل عصيات متطاولة يتراوح طولها من(2 –4) مايكروميتر

تمتلك سوطا قطبيا له دور مهم في الامراضية غير مكونة للأبواغ تشير العديد من الدراسات الى ان جرثومة *Pseudomonas* spp لها دور كبير في اخماج قرحة القدم السكري.

تتميز هذه الجرثومة بكونها انتهازية تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من شدة الإصابة حيث تنتج هذه البكتريا نوعين من الذيفانات الخارجية وهي Exotoxin Aوالحال للدم و (hemolysin) و (Phospholipase) الحال للشحوم الفوسفاتية والانزيم الحال للبروتين(Protease)

فضلاً عن امتلاكها لطبقة عديد السكريد الدهني (Lipopolysaccharide) (LPS) التي تعد من السموم الداخلية (endotoxin) ، كما وتعد صبغة البايوسيانين (Pyocyanin) من عوامل الضراوة التي تنتجها هذه البكتريا ومن العوامل الاخرى لهذه البكتريا امتلاكها الاهداب (Pili) التي تعد من عوامل الالتصاق (Adhesion factors)إذ تلتصق بالخلايا الطلائية لذا تكون الخلايا البكتيرية غير المهدبة (unpiliated) أقل امراضية من الخلايا المهدبة .

كما تلعب اسواط البكتريا دوراً في التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية وبالتالي استقرار البكتريا وتكوين مستعمرات (Colonization). يسبب وجود هذه البكتريا مشكلة في المستشفيات في جميع أنحاء العالم كما يمكن العثور عليها على المعدات مما يزيد من خطر الإصابة بعدوى المستشفيات infections Nosocomial كما تعتبر هذه البكتريا مقاومة للمضادات الحيوية



صورة لقدم سكري مصابة ببكتريا ***Pseudomonas areuginosa***

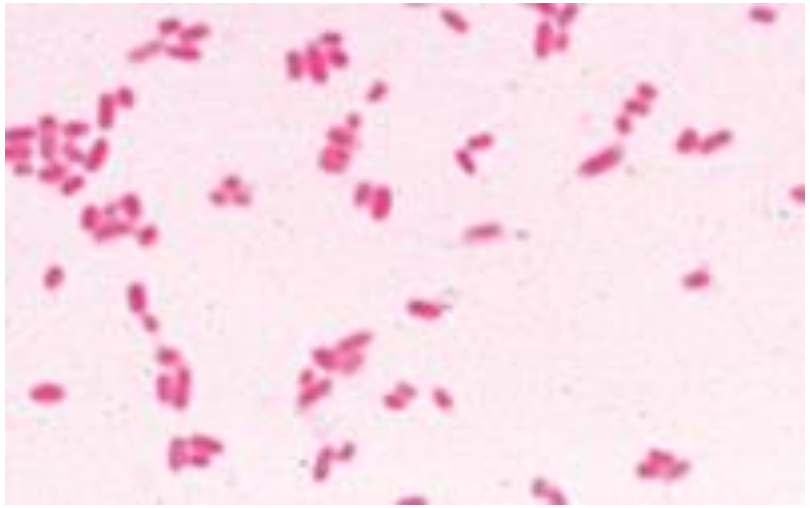
الاشريكية القولونية او العصيات القولونية(*Escherichia coli*)

وهي جراثيم عصوية سالبة لصبغة كرام ، متحركة ، غير مكونة للابواغ ، هوائية ولاهوائية اختيارية لها القدرة على تخمير العديد من السكريات مع إنتاج حامض وغاز تعطي مستعمرات دائرية ملساء تتراوح أقطارها بين (1–3) ملم عند نموها على وسط الاكار المغذي.

تتواجد هذه الجراثيم بصورة طبيعية في أمعاء الإنسان والحيوان وتعد أكثر أفراد العائلة المعوية أهمية فهي جراثيم انتهازية لها القدرة على أحداث العديد من الإصابات مثل التهاب المعدة والأمعاء (Gastroenteritis) الذي يصيب الأطفال الرضع والتهاب الغشاء المسا ريقي (Peritonitis) والتهاب القناة الصفراوية (Cholecystitis) .

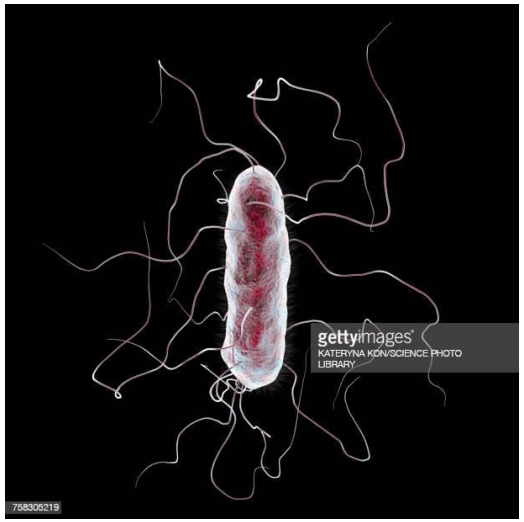
كما إنها قد تسبب التسمم الدموي . فضلا عن العديد من الإصابات المكتسبة في المستشفيات (Hospital acquired infections) مثل التهابات الجروح وذات الرئة وتعد جرثومة *E. coli* من المسببات الرئيسة لالتهاب المجاري البولية.

تمتلك هذه الجرثومة عددا من العوامل التي تساعدها في أحداث المرض مثل إنتاج الذيفانات الخارجية (Exotoxin) والتي تشمل الذيفانات المعوية (Enterotoxins) وكذلك إنتاج الذيفانات الداخلية (Endotoxins) فضلا عن امتلاكها الأهلاب Pili.



-المتقلبات *Proteus mirabilis*

وهي بكتريا سالبة لصبغة غرام تنتمي لعائلة *Enterobacteriaceae* تتميز بحركة تؤدي الى العج (swarming motility) وتتصف بكونها ثنائية الشكل ولها القابلية على التمايز من عصيات صغيرة الى عصيات متطاولة , تكون خلاياها العاجة متعددة الأنوية وتكون مسوطة فضلا عن كونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز توجد هذه البكتريا في التربة والماء والقناة المعوية للبائن بما فيها الإنسان كما أنها تسبب التهابات المجاري البولية والتهابات الجهاز التنفسي والتهابات الجروح وتجرثم الدم Bacteremia (Urinary tract infection , UTI) والتهابات أخرى. تعد بكتريا *P. mirabilis* واحدة من اكثر عوامل الإصابة شيوعا في قرحة القدم السكري كما انها تظهر مقاومة واسعة وسريعة للعديد من المضادات الحيوية والتي تتسبب بتفاقم قرحة القدم السكري وتأخير العلاج.

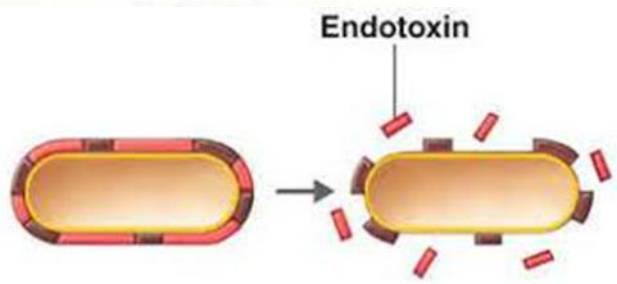


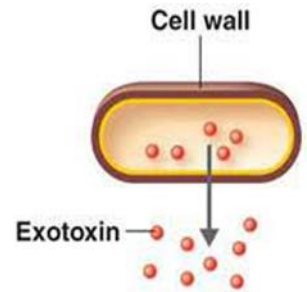
صورة لبكتريا *P. mirabilis*

أهم المميزات والفروق بين السموم الميكروبيه الخارجيه والداخليه

السموم البكترية

وجه المقارنة	السموم الخارجية	السموم الداخلية
الإفراز.	البكتريا المفرزة للسم .	السم:ـ جزء من الجدار الخلوي للبكتريا يخرج إلى العائل عند موت البكتريا وتحللها.
الحرارة.	تتأثر بالحرارة .	تتحمل الحرارة .
القـــــــوة الأنتيجينة.	عالية .	منخفض .
النوع.	البروتينات .	دهون وسكريات .
تحفيـز جهـاز المناعة.	تحفزه .	لا تحفز المناعة .
التحـول إلـى توكسيد.	تتحول .	لا تتحول .
القوة السمية.	عالية .	منخفضة .
الأعراض.	متخصصة .	كلها تسبب انخفاض في الضغط الدموي





التشخيص:

يعتمد التشخيص الأولي لعدوى القدم السكرية على التاريخ المرضي والفحص السريري الذي يشمل معاينة القدم وتقييم الجروح وفحص النبض والوظائف العصبية.

يجب أخذ التاريخ المرضي لإصابات القدم الحديثة، وفحص الأطراف السفلى بحثاً عن علامات الإصابة التي تشمل: الاحمرار، التصلب، الانتفاخ، التقرح مع قيح وإفرازات، أو تشوهات عظمية. من الممكن أن تحدث التقرحات في غياب العدوى المرضية. ويعتمد تشخيص الجرح المصاب عادة على وجود علامتين أو أكثر من علامات الالتهاب. ويجب اجراء الفحوصات التالية :

- فحص نبض الشرايين المحيطية سريرياً. وفي حالة عدم الإحساس بهما فيستخدم السونار مع حساب مؤشر الضغط الكاحلي العضدي لتحديد وجود مرض الشرايين المحيطية من عدمه.
- فحص التقرحات والجروح العميقة ومعرفة مدى عمقها وتحديد وصولها إلى العظم ما يعني حدوث التهاب العظم ونخاعه يشمل الفحص العصبي فحص الإحساس المحيطي بالاهتزاز والحرارة والألم، وكذلك فحص المنعكسات الوترية العميقة.

- من الممكن استخدام التصوير الإشعاعي لتقييم العدوى بشكل أفضل. ويعد التصوير بالأشعة السينية الأكثر شيوعاً حيث يُظهر الكسور، والتهاب العظم ونخاعه، وتجمع الغاز في حالة العدوى بجراثيم مكونة للغاز، وتكلس الأوعية الدموية أو وجود أجسام غريبة.
- يفيد التصوير بالرنين المغناطيسي في تحديد عمق العدوى في الأنسجة الرخوة ووجود التهاب العظم ونقيه، خاصة لدى المرضى الذين لا يستجيبون للعلاج الأولي بالمضادات الحيوية .
- اختبارات الزراعة على الاوساط الغذائية والتي عادة ٢–٣ أيام إلى أسبوع واحد للزرع وتحديد البكتيريا ، في حين أن طرق التحليل الجديدة من خلال استخدام أحدث تقنيات الوراثة الجزيئية التي تحدد البكتيريا المسببة في غضون يوم واحد.

ومن المتوقع أن تساهم هذه التقنيات في تحسين تشخيص المرضى من خلال التشخيص الدقيق للبكتيريا المسببة لعدوى القدم السكري و يمكن أن تكشف سبب عدوى القدم السكرية وتغيير نموذج العلاج الحالي ".

النصائح التالية خاصة بحماية القدمين من مخاطر التهاب القدم السكري :

- ❖ اغسل قدميك بمياه دافئة كل يوم ولا تستخدم مياه ساخنة على الاطلاق لأن ذلك قد يؤذى قدميك.
- ❖ جفف قدميك جيدا بعد غسلهما بالماء والصابون وخصوصا بين الاصابع لأن البلل قد يؤذى القدمين ويتسبب في حدوث التهابات وعدوى بكتيرية وفطرية بهما.
- ❖ استخدم كريم مرطب لعلاج الجفاف الذى يصيب القدم مع مرضى السكر ولا تضع بودرة او اى كريمات مرطبة بين الاصابع.
- ❖ افحص قدميك يوميا وعالج الاصابات التي قد تجدها حتى ولو كانت اصابات بسيطة . ربما تحتاج إلى مرآة لذلك. تأكد من عدم وجود لون أبيض أو أسمر (فطريات) بين الاصابع ، و في حالة وجودها يجب علاجها على الفور.. استشر طبيبك.
- ❖ قلم اظافرك بعناية فائقة وتجنب احداث أي جرح بالأصابع وفى حالة حدوث أي جرح بالأصابع استشر طبيبك.
- ❖ ارتدى جوارب قطنية نظيفة وتجنب استخدام الاصناف الخشنة المصنوعة من ألياف صناعية.
- ❖ لا تمشى عاري القدمين حتى ولو كنت داخل منزلك ولا ترتدى احذية صيفية مفتوحة فقد تصطدم قدميك بأشياء حادة اثناء المشي.
- ❖ اعتنى باختيار الحذاء الذى ترتديه على أن يكون حذاء طريا ومناسبا لحجم القدم ولا يسبب أي احتكاكات قد تؤذى القدمين. افحص حذائك جيدا قبل ان ترتديه فقد يدخل به اجسام غريبة او حادة دون ان تعرف فتؤذى قدميك وتبدأ مشكلة خطيرة من اشياء بسيطة جدا.

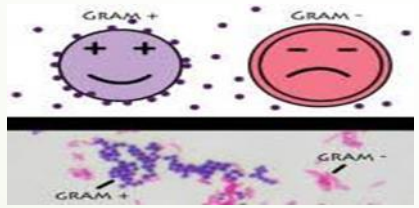
3-5 min
<40℃
FOOT CARE
IN DIABETES

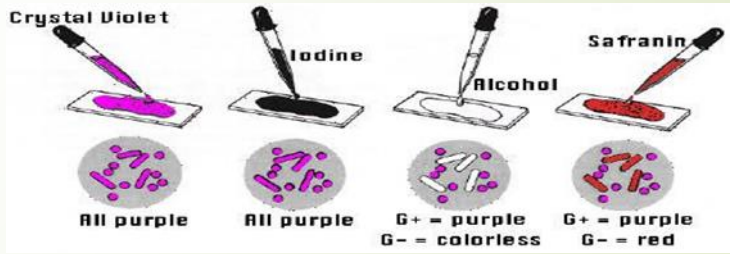
بعض التقنيات المستخدمة في تشخيص البكتريا
Some techniques used in diagnosing bacteria

تشخيص البكتيريا هو عملية حاسمة لتحديد نوع البكتريا واختيار العلاج المناسب.

طرق تشخيص البكتيريا

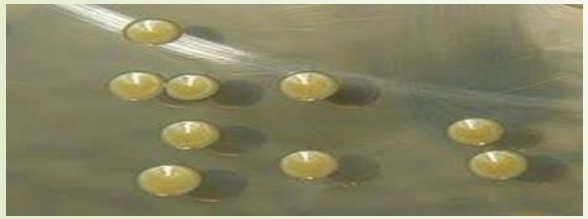
- الفحص المجهري Microscopic examination
- مظهر المزرعة Cultural appearance
- الأختبارات البايوكيميائية Biochemical test
- التشخيص المصلي Serological identification
- الطرق الجزيئية Molecular methods
- **1-الفحص المجهري Microscopic examination**



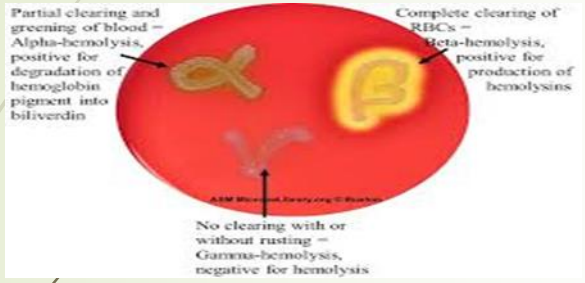


2 -مظهر المزرعة Cultural appearance

- انتاج الصبغات Pigment production
- صبغات داخلية Endopigment تظهر على المستعمرة مثل الصبغة الصفراء الذهبية لمستعمرات بكتريا *Staphylococcus aureus*



- صبغات خارجية Exopigment حيث ينتشر اللون ويحيط بالوسط الغذائي مثل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*



التحلل على وسط اكار الدم Hemolysis on blood agar

التحلل الكامل beta hemolysis مثل *S.aureus*

او تحلل جزئي alpha hemolysis مثل *Strepto.viridans*

او عدم حصول تحلل gamma hemolysis مثل Enterococcus

تخمر اللاكتوز على وسط الماكونكي MacConkey,s agar

تخمر اللاكتوز Lactose fermenters تظهر المستعمرات بلون وردي مثل *E.coli*

غير مخمرة للاكتوز تظهر المستعمرات شاحبة مثل *Salmonella typhi*

3-الأختبارات البايوكيميائية Biochemical test

الاختبارات البيوكيميائية هي مجموعة من التقنيات المُستخدمة لتحديد أنواع البكتيريا بناءً على نشاطها الأيضي وإنتاج إنزيمات معينة. تعتمد هذه الاختبارات على اختلاف البكتيريا في قدرتها على تفكيك مواد محددة (مثل الكربوهيدرات أو البروتينات) أو إنتاج نواتج أيضية مميزة (كالأحماض أو الغازات).

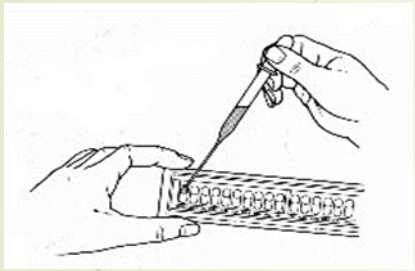
- اختبار الاندول Indol test
- اختبار اليوريز Urease test
- اختبار تحلل الجيلاتين Gelatinase test
- اختبار الكتاليز Catalase test
- اختبار الأوكسديز Oxidase test
- تخمر السكريات Sugar fermentation

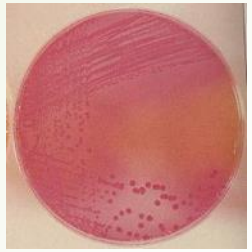
اختبار الحركة Motility test

يستخدم لمعرفة قابلية البكتريا على الحركة

4- اختبار Analytical profile index(API)

اختبار (Analytical Profile Index) API:- هو نظام تشخيصي مُصغَّر يُستخدم لتحديد هوية البكتيريا بناءً على خصائصها الكيميائية الحيوية (البيوكيميائية). طورته شركة(bioMérieux) ويُعتبر أحد الطرق التقليدية الشائعة في المختبرات السريرية والميكروبيولوجية ويضم ٢٠ اختبارا يحتوي على مواد التفاعل بهيئة جافة .





طريقة عمل الاختبار

تحضير العينة:

1 . تُزرع البكتيريا المعزولة (من مزرعة نقية) في وسط سائل أو صلب لضمان نموها.

2 – تُحضَّر معلق بكتيري معياري لتوحيد كثافة البكتيريا.

3. إضافة العينة إلى الشرائط (API Strips): – تتكون شرائط API من عدة حُجيرات صغيرة (أحواض) تحتوي على مواد التفاعل (Substrates) وتعني المادة الغذائية التي ينمو عليها الميكروب أو أي مادة كيميائية تخضع تحت عمل إنزيم مثل السكريات.

4– تُملأ كل حُجيرة بالمعلق البكتيري، وتُغلَّق الشرائط وتُحضَّن عند درجة حرارة مناسبة (عادة ٣٧°م لمدة ١٨–٢٤ ساعة).

. 5- تضاف الكواشف الخاصة بالاختبارات مثل: TDA- IND- VP، تتفاعل البكتيريا مع الادلة في الحُجيرات، مما يؤدي إلى تغييرات لونية (بسبب تغير الأس الهيدروجيني، إنتاج غاز، أو تحلل المواد) تُقرأ بالعين المجردة أو بواسطة قارئ آلي وتسجل النتائج.

6. تفسير النتائج:

- تُسجل النتائج الإيجابية والسلبية لكل تفاعل على شكل رمز رقمي (على سبيل المثال: 5-2-0-7

7- يُقارن هذا الرمز مع قاعدة بيانات API لتحديد نوع البكتيريا بدقة.

أنواع شرائط API الشائعة

- ❖ API 20E: لتحديد البكتيريا السالبة لصبغة كرام (مثل الإشريكية القولونية *E.coli*، والسالمونيلا Salmonella).
- ❖ API Staph: للبكتيريا موجبة لكرام مثل *المكورات العنقودية (Staphylococcus).
- ❖ -API Candida: للفطريات مثل المبيضات (Candida).
- ❖ API NH: للبكتيريا السالبة لكرام صعبة النمو مثل النيسيريا (Neisseria).

مزايا اختبار API:

- سريع: النتائج خلال ٢٤ ساعة.
- اقتصادي: مقارنةً بالتقنيات الجزيئية المتقدمة.
- سهل الاستخدام: لا يتطلب معدات معقدة.

عيوبه- حساسية محدودة: قد لا يميز بين سلالات متشابهة جدًا.

- اعتماده على المزرعة النقية أي خطأ في العزل يؤدي لنتائج خاطئة.
- لا يناسب جميع البكتيريا: بعض الأنواع تحتاج تقنيات متقدمة لتشخيصها.

5- نظام تشخيص البكتريا الألي Automated bacterial identification systems

جهاز ال Vitek system

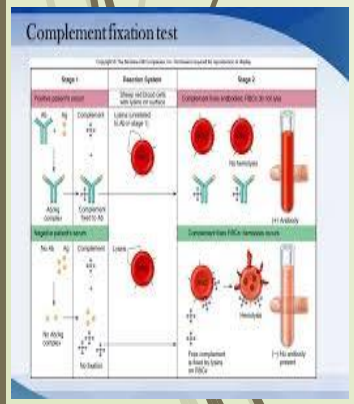
- يستخدم الجهاز لتشخيص البكتريا ولأجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية من خلال تحديد التغير باللون او العكورة في بطاقات بلاستيكية خاصة ملقحة بالبكتريا

جهاز ال Vitek

6-التشخيص السيرولوجي Serological identification

تحديد المستضد Antigen detection مثل Latex agglutination فحص الاليزا ELISA

- تحديد الأجسام المضادة Antibody detection
- مثل اختبار التلأزن ،اختبار تثبيت المتمم complement fixation tests



الطرق الجزيئية Molecular methods

7- التشخيص بتقنية Polymerase Chain Reaction (PCR)

هوتقنية مخبريه تقوم على أساس تصنيع نسخ عديدة من قطع الحمض النووي DNA في المختبر (in vitro).

بحيث يقوم الجهاز برفع درجة الحرارة إلى ٩٥ درجة مؤية

فينفصل الحمض النووي إلى جزئين ..

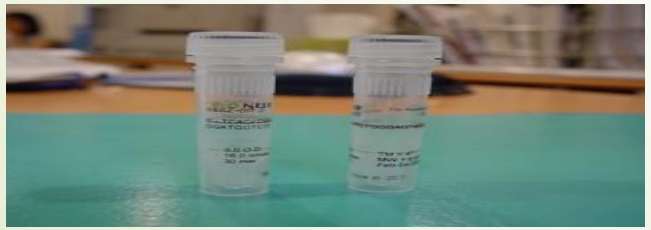
وبإضافة إنزيمات لكل جزء تساعد على إنتاج مئات النسخ من النسخة الأصلية

الهدف : تسهيل إجراء الاختبارات و الأبحاث وفحوصات إضافية.

متطلبات تقنية PCR

١.**عينة التفاعل او يسمى قالب الحمض النووي(DNA Template)**. يتمثل في DNA المراد تضخيمه وهذا التضخيم لايشمل القالب بأكمله وانما جزء منه وهذا ما يسمى الجزء المستهدف.

- **البادئات (Primers):-** قطعة صغيرة من DNA بشريط مفرد يكون مكملا في تتابعه للقواعد النايتروجينية على طرفي الجزء المستهدف وهي ضرورية للشروع بتضاعف ال DNA .تتراوح اطوال ال primer المستخدمة في PCR مابين ٢٠-٣٠ قاعدة نتروجينية. ولاجراء التجربة يتطلب نوعان من البوادئ



- أمامي (Forward). وخلفي (**Reverse**).

-انزيم التفاعل (DNA polymerase) أو(Taq polymerase):

مستخرج من سلالة بكتيريه تسمى ***Thermus aquaticus*** التي تتواجد طبيعياً في الينابيع الحارة. وهو أساسي حيث يعمل على تحفيز عملية التضاعف وبالتالي تضخيم DNA ويمتاز بانه لايتأثر بدرجات الحرارة المرتفعه حيث ان درجه الحراة المثلى له ٧٢ °م.

٤. **النيوكليوتيدات** :يتم تجهيزها على شكل نيوكليوسيدات ثلاثي الفوسفات منقوصة الاوكسجين (deoxynucleosides triphosphate dNTPs) وبانواعها الأربعة التي تدخل في بناء DNA.

٥. **محلول منظم (PCR Buffer10x).**

٦. **املاح مناسبة**، أهمها املاح المغنيسيوم Mg+2 التي تعتبر عامل متمم Cofactor لأنزيم البوليمراز

٧. **ماء مقطر (DDW).**

٨. **جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي(Thermocycler):-**

يقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع و دقيق و متتالي لأن تغير درجة الحرارة مهم في عمليه التضاعف

خطوات تقنية PCRثلاث مراحل في الدورة الواحدة

١ـمرحلة التفكيك Denaturation الحراري:

يتم رفع درجة الحرارة إلى ٩٤ ْم وذلك لفك الشكل المزدوج للحمض النووي (DNA) الأصل d.s. DNA . الى s.s.DNA

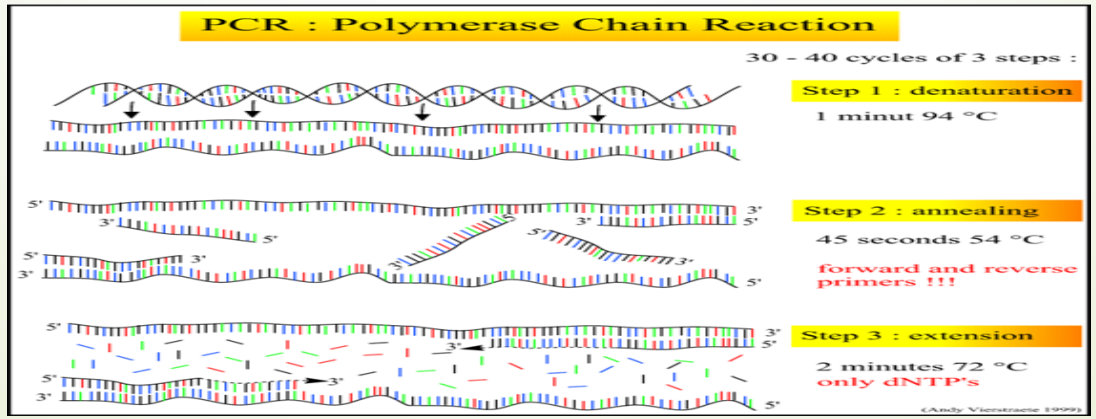
٢ـ مرحلة التصاق البادئات Primers annealing:

يجب خفض درجة الحرارة إلى ما بين ٥٥ـ٦٠ ْم ليقوم البادئات بالألتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل.

٣ـ مرحلة الامتدادExtension:

يقوم برفع درجة الحرارة إلى ٧٢ ـ ٧٥ ْم ليقوم انزيم البلمرة بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد. في وجود dNTPs.

وهذه المراحل الثلاث تمثل دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات بشكل أسي .



صوره (١): توضح خطوات تقنية PCR

لحساب عدد الدورات اللازمة في جهاز الـ PCR

يحسب عامل التضخيم بالمعادلة التالية

$$x = n\ (1+E)$$

حيث = nالكمية البدائية للحمض النووي الهدف

= Eفعالية التضخيم(Efficiency)

X =عدد دورات PCR

أنواع تقنية الـ PCR

PCRالعادي : وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة.

Real–Time PCR : وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد يكون مربتط الجهاز بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدا التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA)ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك . مما يسهل على الباحثين الوقت لتحدد وجود الجين المطلوب أو لا ، وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة .

الفينولات

ا.م.د. مرا اسامه احمد
م.د. نوار طلال حامد
م.د. عمر عبدالعزيز احمد

تقنيات حياتية 2024-2025

www.fppt.info

المركبات الفينولية

Phenolic Compounds

Secondaryهي من اكثر مركبات الايض الثانوي
انتشارا في المملكة metabolism compounds
Aromatic ringالنباتية اذ تتألف من حلقة اروماتية
ترتبط مع مجموعة هيدروكسيلية واحدة او اكثر وتكون
ذائبة في الماء، حيث ترتبط مع وحدة سكر بشكل
في نسيج النبات، ولقد تم Glycosidesكلايكوسيدات
من المركبات الفينولية 8.000التعرف على اكثر من
الموجودة في النباتات بدلالة هيكلها الكربوني
وتصنف الى
الفينولات البسيطة
الاحماض الفينولية
الفلافونويدات
الكومارينات
التانينات

www.fppt.info

www.fppt.info

تشخيص المركبات الفينولية
باستخدام تقنية

TLCكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة

ولقد تَمّ استخدام نظام

مزيج المذيبات (محلول الفصل) بيوتانول: حامض الخليك الثلجي: ماء مقطر بنسب :
:70:25: 5على التوالي كطورمتحرك) للمركبات الفينولية مع استخدم نظام مزيج5
factor (R_f) كما في المعادلة التالية :-

$$\text{معامل الانسيابية} = \frac{\text{المسافة التي يقطعها المركب في محلول الفصل}}{\text{المسافة التي يقطعها محلول الفصل}}$$

www.fppt.info

المضادات الحيوية-

المضادات الحيوية الطحلبية

ا.م.د. مِرا اسامه احمد

المقدمة:

تعتبر الطحالب مصدراً غنياً بالمركبات الحيوية النشطة، بما في ذلك المضادات الحيوية. وقد أظهرت الدراسات أن العديد من أنواع الطحالب قادرة على إنتاج مركبات ذات فعالية مضادة للبكتيريا والفطريات والفيروسات.

أنواع المضادات الحيوية الطحلبية:

* الأحماض الدهنية: تنتج بعض الطحالب أحماضاً دهنية غير مشبعة ذات فعالية مضادة للميكروبات.
* المركبات الفينولية: تحتوي الطحالب على مركبات فينولية مثل والتي تمتلك خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للميكروبات.
* المركبات الكبريتية: تنتج بعض الطحالب مركبات كبريتية مثل مركبات الهالوثيون، والتي تمتلك فعالية مضادة للبكتيريا والفطريات.
* الببتيدات: تنتج بعض الطحالب ببتيدات مضادة للميكروبات، والتي تعمل على تدمير أغشية الخلايا الميكروبية.
* التربينويدات: تنتج الطحالب مجموعة متنوعة من التربينويدات، والتي تمتلك خصائص مضادة للميكروبات ومضادة للالتهابات.

الطحالب(Algae) كائنات حية ذاتية التغذية وهي تمثل مجموعة واسعة من الكائنات التي لها القابلية على القيام بعملية البناء الضوئي، وهي واسعة الانتشار على سطح الكرة الارضية اذ تعيش في البيئة اليابسة و البيئة المائية.

النواتج الطبيعية Natural Products

هي المواد الكيمائية التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة والنباتات اذ تعتبر النواتج الطبيعية من الاكتشافات الرائعة المضادة للأحياء المجهرية الممرضة والنواتج الطبيعية تنتج من خلال نوعين من مركبات الايض هما:-

A- مركبات الايض الاولي
Primary metabolism
compounds

B- مركبات الايض الثانوي
Secondary metabolism
ومنها compounds

تحضير المستخلص الايثانولي الخام واستخلاص المواد العضوية

5 غم وزن جاف + 100% كحول ايثانولي

توضع في جهاز السكسوليت لمدة 24 ساعة

أخذ 100 مل مستخلص ايثانولي واضافة حامض الخليك الثلجي حتى يصبح pH = 3

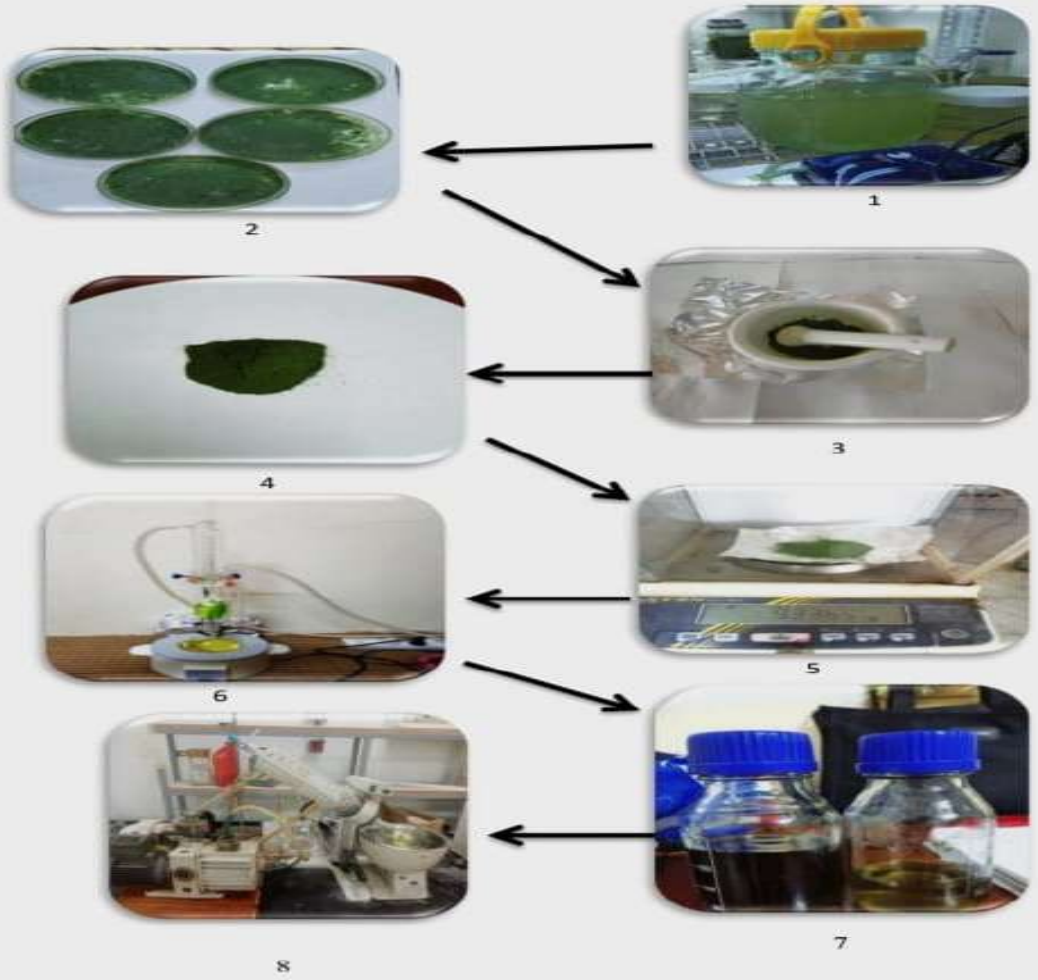
رشح المستخلص واضافة الكلوروفورم بنسبة 2: 1 في قمع الفصل، يفصل الى طبقتين مائية وعضوية

الطبقة المائية اضيف اليها كاربونات الصوديوم حتى يصبح pH 10

الطبقة العضوية اضيف اليها الكلوروفورم وفصلت الى طبقة مائية وعضوية

أخذت الطبقة العضوية وركز حجمها بالمبخر الدوار

مراحل عملية الاستخلاص



الشكل (4) مراحل عملية الأستخلاص

93365

الفعالية المضادة للبكتريا

تختلف حساسية الاجناس المختلفة للبكتريا تجاه المستخلصات الطحلبية بالاعتماد على طبيعة وتركيب المحتويات الخلوية لكل نوع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام بالاضافة لاختلاف انواع الطحالب لاختلاف العوامل الفسلجية والبيئية فمثلاً الوقت الذي يتم فيه جمع الطحالب وطريقة تنميتها وحفظها بالاضافة الى نوع المستخلص وطريقة الاستخلاص .ان احد اسباب تثبيط مستخلصات الطحالب هو احتوائها على مركبات دهنية وبروتينية ستيرودية لها تأثير مثبط على البكتريا كما ان الاصباغ مثل الكلوروفيل والكاروتين لها نشاط ضد البكتريا وللاحماض الدهنية نشاط مضاد للجراثيم ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام .اما عند دراسة الفعالية المضادة للبكتريا

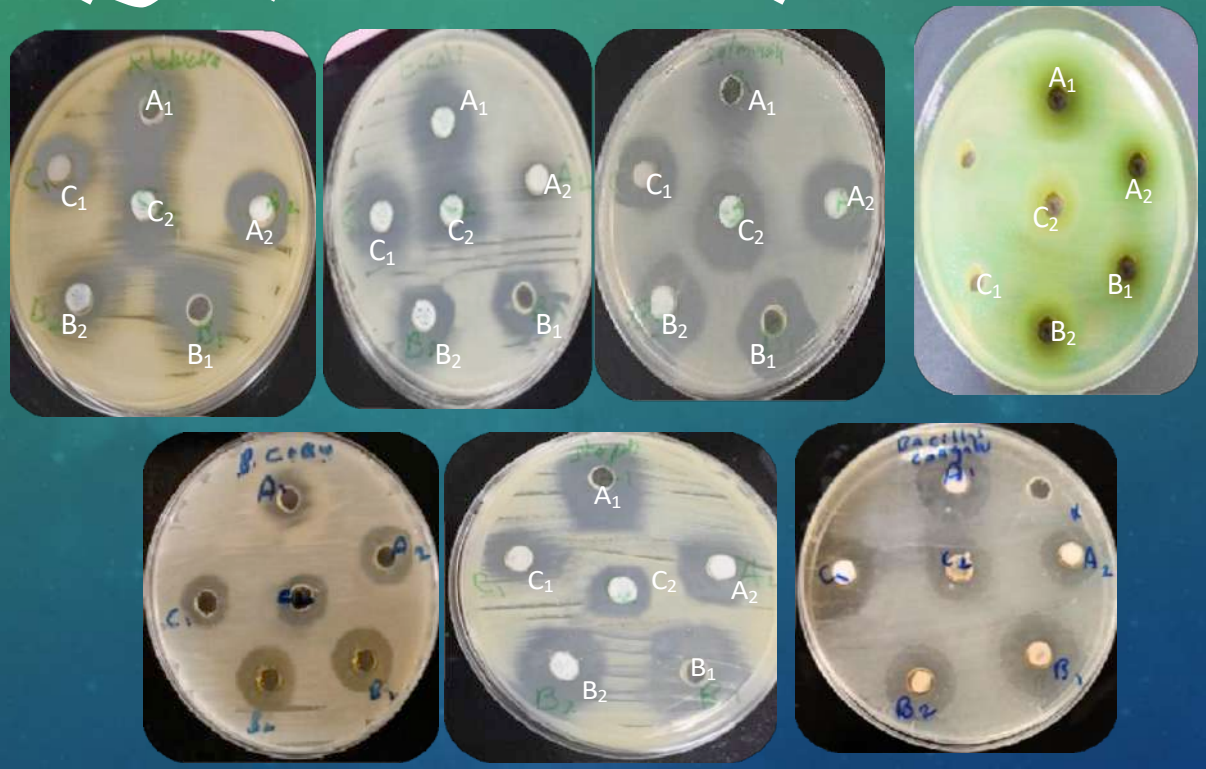
للمستخلص Chara ,Chorella كانت له فعالية ضد البكتريا P.aeruginosa, B.cereus, S.aureus, E.coli .
الهكساني لطحلب

الفعالية المضادة للبكتريا

كما ان للمستخلص الفينولي للطحلب *Cosmarium*

فعالية مضادة للبكتريا المرضية وقد يعزى التأثير الفعال ضد البكتريا باقطار تثبيط عالية لقدرتها على تحليل الغشاء الخلوي للخلية البكتيرية والنفاذ الى داخل الخلية وتحرير مكوناتها الى الخارج .

الفعالية المضادة للبكتريا



الفعالية المضادة للفطريات

ان الطحالب الخضر المزرقة والطحالب الخضر تنتج مركبات مضادة للفطريات ويرجع السبب الى فعالية المركبات المنتجة من الطحالب لاحتوائها على ببتيدات حلقية وفلوريدات وسكريات دهنية متعددة .

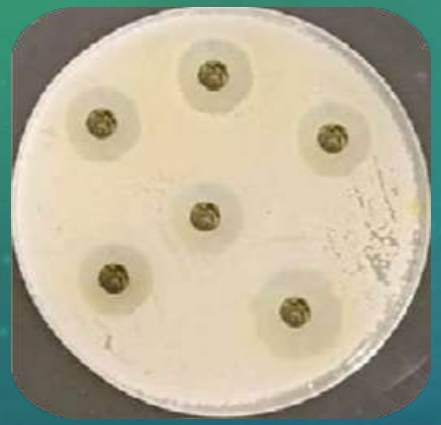
تبين من خلال الدراسات ان موقع وعدد مجموعات الهيدروكسيل على مجموعة الفينول مرتبطان بسميتهما النسبية للكائنات الدقيقة وتأثيرها على غشاء الخلية الفطرية الذي يغير نفاذيتها .بينما المستخلص الفينولي لكافة الطحالب كان ذا تأثير واضح ضد الفطريات المرضية

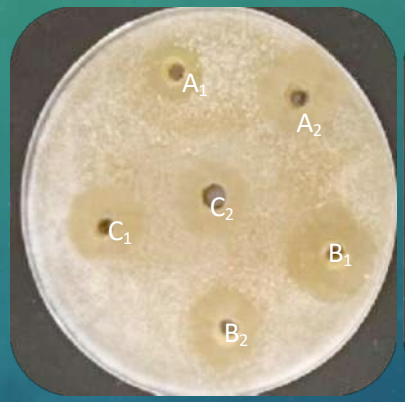
اما عند استخدام المستخلص الايثانولي لبعض انواع الطحالب الخضراء اذ قامت بتثبيط انواع معينة من الفطريات .

تنتج الطحالب الخضر المزرقة مركب Norhamane وهومركب قلويدي يثبط عمل بعض الانزيمات ويحث على الموت المبرمج .

- وتنتج الطحالب الخضر والخضر المزرقة مركبات مضادة للفطريات لها تأثير اكبر مقارنة مع المضادات الحيوية ويرجع السبب في فعالية المركبات المنتجة من الطحالب لاحتوائها على ببتيدات حلقية وقلويدات وسكريات دهنية متعددة .

الفعالية المضادة للفطريات





آلية عمل المضادات الحيوية الطحلبية:

- تختلف آلية عمل المضادات الحيوية الطحلبية باختلاف المركب الحيوي النشط. ومع ذلك، تشمل بعض الآليات الشائعة ما يلي:
  - * تثبيط تخليق الجدار الخلوي للميكروبات.
  - * تثبيط تخليق البروتين في الميكروبات.
  - * تدمير أغشية الخلايا الميكروبية.
  - * تثبيط تكاثر الفيروسات.
- أهمية المضادات الحيوية الطحلبية:
  - * تعتبر المضادات الحيوية الطحلبية مصدراً واعداً للمضادات الحيوية الجديدة، خاصة في ظل تزايد مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية التقليدية.
  - * تمتلك المضادات الحيوية الطحلبية خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات، مما يجعلها مفيدة في علاج مجموعة متنوعة من الأمراض.
  - * تعتبر الطحالب مصدراً متجدداً للمضادات الحيوية، مما يجعلها بديلاً مستداماً للمضادات الحيوية التقليدية.

تطبيقات المضادات الحيوية الطحلبية:

* يمكن استخدام المضادات الحيوية الطحلبية في علاج الالتهابات البكتيرية والفطرية والفيروسية.
* يمكن استخدام المضادات الحيوية الطحلبية في صناعة المستحضرات الصيدلانية ومستحضرات التجميل.
* يمكن استخدام المضادات الحيوية الطحلبية في الزراعة وتربية الأحياء المائية.
* التحديات:
* لا تزال الأبحاث حول المضادات الحيوية الطحلبية في مراحلها الأولى، وهناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتحديد المركبات الحيوية النشطة وتطويرها.
* قد يكون من الصعب استخلاص وتنقية المضادات الحيوية الطحلبية بكميات كبيرة.
* تتطلب زراعة الطحالب ظروف بيئية خاصة قد يصعب توفيرها.

الخلاصة:

- تمثل المضادات الحيوية الطحلبية مصدراً واعداً للمضادات الحيوية الجديدة، ولها القدرة على المساهمة في علاج مجموعة متنوعة من الأمراض. ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من الأبحاث لتطوير هذه المضادات الحيوية وجعلها متاحة للاستخدام على نطاق واسع.

شكراً
لاصغاكم