الجمهورية العربية السورية

جامعة حماة

المعهد التقاني للطب البيطري

مقرر مادة علم الطفيليات ١

لطلاب السنة الثانية

اختصاص مخابر بيطرية

الجزء العملي

مدرّسة المقرر :د. قمر المحيميد

العام الدراسي ٢٠١٨ /٢٠١٩ م

الفصل الأول

أسس وطرائق تشخيص الأخماج الطفيلية

مخارج الطفيليات:

تطرح الطفيليات إلى الوسط الخارجى بعدة طرق وهى مرتبطة بمكان تطفلها فى الجسم أما بالنسبة للطفيليات الخارجية فلا تحتاج إلى منفذ يوصلها إلى الوسط الخارجي لوجودها فيه

أما الطفيليات الداخلية فهى تحتاج إلى مسلك تسلكه لتخرج من الجسم إما بشكلها أو بأحد أطوار تطفلها وهذه المخارج :

١_مفرغات القناة الهضمية :تخرج بواسطتها أغلب الطفيليات المعوية مثل الشريطيات والمثقوبات ،أو طفيليات فى أعضاء أخرى مثل المتورقة الكبديةالتى تتطفل فى الكبد أ وجانبية المناسل الوسترمانية التى تتطفل على الجهاز التنفسي وتصل للجهاز الهضمي عن طريق البلعوم ٠

٢_المفرغات البولية التناسلية:تسلكها المشعرة المهبلية والمثقوبات مثل المنشقات الدموية

٣_القشع والمفرزات الأنفية:تخرج بواسطتها الطفيليات الرئوية والأنفية مثل بيوض جانبية المناسل الوسترمانية ويرقات النبر الأنفي

٤_الجلد والأنسجة المصابة :تسلكه بعض الطفيليات فاعلة مثل التنينة المدينية ،أو تخرج عبره منفعله بواسطة مفصليات الأرجل الماصة للدم مثل المتصورات .

٥_طفيليات عديمة الاخراج:الكيسة المذنبة البقرية ،الكيسة العدارية

العينات المأخوذة للفحص الطفيلي:

يجب مراعاة الأمور التالية عند أخذ العينات:

١_اختيار العينة المناسبة للفحص المخبري .

٢_اختيار الطريقة المناسبة.
٣_وعى وخبرة القائم على اجراء الفحص بمكان وجود الطفيليات ومخارجها.
٤-يفضل أن يقوم بأخذ العينة اختصاصي بالعمل المخبري.
٥-اختيار الوقت المناسب لأخذ العينة خلال فترة سير المرض.
٦-أخذ العينات بهدف التشخيص الطفيلي يجب ان يكون قبل المعالجة.
٧-العمل على ارسال العينات بسرعة الى المخبر وذلك لسرعة تخرب العينات أو حصول تغيرات في أشكال الأتاريف الطفيلية
ويجب اضافة مادة حافظة فى الحالات التى يؤجل فيهاالفحص لوقت طويل .
٨-يجب التعريف بالعينة المرسلة إلى المخبر (نوع العينة،تاريخ أخذها،المراد المشبه المراد فحصة ،والعلاجات المستخدمه).
أنواع العينات المأخوذه للفحص الطفيلي:
١_البراز:للكشف عن طفيليات الجهاز الهضمى والأعضاء الملحقة مثل الديدان الكبدية.....
٢_الدم:للكشف عن الاصابة بالأوالى الدموية او بعض الديدان الخيطية مثل المتصورات.
٣-البول:للكشف عن بيوض المنشقات الدموية.
٤-القشع :للكشف عن الاصابة بديدان جانبية المناسل الوسترمانية.
٥-تحضير لطاخات:من التقرحات الجلدية للكشف عن الاصابة باللشمانية، اومن الأحشاء الداخلية للكشف عن المقوسة القندية .
٦-الخزعات :يتم الحصول عليها من العضلات بهدف الكشف عن الاصابة بـ المقوسة القندية.
٧-الماء:للكشف عن تلوث مياه الشرب ببيوض الديدان،والأوالي،والقشريات.

طرائق تشخيص الأخماج الطفيلية:

يتم تشخيص الطفيليات وأمراضها سريرياً ومخبرياً :

1- التشخيص السريري (الإكلينيكي) :

ويتم ذلك بدراسة الأعراض المرضية التى تظهر على الثوى ولاسيما النمطية والنموذجية منها (إسهال وإسهال مع نزوفات دموية، إستسقاء تحت الجلد، وضيق التنفس.... وغيرها) .

2- التشخيص المخبري :

ويكون التشخيص المخبري عموماً مباشراً، أو غير مباشراً :

أ- التشخيص المباشر : ويتم ذلك بالبرهان على الطفيليات نفسها أو منتجاتها التناسلية وذلك وفق ما يلي :

1- الفحص العيانى (بالعين المجردة) : وبذلك يمكن العثور على قطع الديدان الشريطية أو ديدان الصفر مثلا ً .

2- الفحص المجهرى : ويثبت هذا النوع من التشخيص وجود البيوض أو كيسات البيض أو اليرقات أو الديدان والطفيليات الخارجية.

3- التشخيص الزرعى : إذ يمكن البرهان على الطفيليات بعد إكثارها مخبرياً في المزارع (المستنبتات) .

4- التشخيص التلقيحى : ويعنى ذلك إكثار الطفيليات فى حيوانات التجربة كالفئران والضفادع ثم كشفها.

5- التشخيص الثوائي : ويعتمد ذلك على كشف الطفيلى المسبب فى الكائن الحي الناقل بعد أن يتم خمجه تجريبياً .

ب- التشخيص غير المباشر : ويتم ذلك بدراسة التغيرات والتفاعلات المختلفة الناتجة عن وجود الطفيلى وفعله فى الثوى ولاسيما النسيجية أو الخلطية:

1- التشخيص النسيجى : مشاهدة تغيرات نسيجية معينة (أورام أو تقرحات وغيرهما) .

2- التشخيص الخلطى : وهو يستند على تأكيد التبدلات التى تحدث فى أخ لاط وسوائل الجسم، ويمكن تقسيمها إلى :

1- تغيرات خلوية : تغيرات فى الصيغة الكروية للدم كزيادة الكريات البيض، أو نقص الكريات الحمراء وغيرها .

2- تغيرات فيزيائية: كاختلاف التوتر السطحي .

3- تغيرات كيميائية: كارتفاع (شوارد) معينة في السائل النخاعي .

4- تغيرات مناعية : وذلك بتشكل أضداد راصّة أو مرسّبة أو حالّة أو مثبّتة للمتمم ، وتستخدم الاختبارات المصولية المناعية فى تشخيص الأوالى و الديدان، ومن هذه الاختبارات (IFAT , ELISA) .

الفصل الثاني
فحص البراز

يجرى فحص البراز لتشخيص الطفيليات التى تصيب القناة الهضمية وملحقاتهاوالجهاز التنفسى حيث تخرج البيوض أو اليرقات او الأطوار الكيسية أو النشطة مع البراز.

أ-طرق جمع العينات:

يفضل أن تكون العينة طازجة وخالية من الشوائب وتختلف طرق جمعها باختلاف الحيوان ففي:

الحيوانات الكبيرة:تؤخذ عينة البراز من المستقيم مباشرة أثناء الجس المستقيمي ،او تؤخذ العينة من الروث الحديث فور نزولة على الأرضية.

الحيوانات الصغيرة:يمكن اثارة الحيوان ،وذلك بادخال الأصابع عبر فتحة الشرج أو اعطاءالحيوان حقنة شرجية من المحلول الفيزيولوجى أو الماء الدافئ،وغى اللواحم تؤخد كمية البراز القليلة العالقة على ميزان الحرارةللفحص مباشرة.

الدواجن:يجمع الزرق الحديث من أرضية الحظيرة .

يجب أن يكون فحص العينة مبكراً او خلال نصف ساعة على الأكثر من وقت الحصول عليها لسرعة تخربها وحصول تغيرات فى أشكال النواشط وفى حال كان الوصول السريع للمخبر متعذر يجب اضافة أحد المحاليل الحافظة إلى العينة ومنها:

١-محلول Barbagalao3%:يحضر بمزج لتر ماء+٣٠غ ملح طعام +٣٠مل فورمالين .ويحفظ هذا المحلول العينة لمدة لاتزيد عن أسبوعين .

٢-محلول ٢-٢،٥%ثانى كرومات البوتاسيوم :يستخدم لحفظ الكيسات البيضية (الايميرية،البوغيات الخفية)عند الدرجة أربعة درجة مئوية لمدة ثلا ثة أشهر.

٣-مزيج مؤلف من :٥مل فورمالين +٥مل غليسرين+٢٥ مل ماء .

العينات المراد تشخيص الديدان الرئوية بها:

يجب عدم اضافة أى مادة حافظة لها ولكن يتوجب حفظها فى درجة حرارة بين صفر وأربعين درجة مئوية حتى يتم فحصها في أقرب وقت ممكن.

ملاحظة :يجب اضافة المادة الحافظة لعينة البراز بنبسة(١:٤).

ب-عنونة العينة:

يجب التعريف بكل عينة مرسلة إلى المخبر بكتابة الآتي:

نوع الحيوان وجنسه،رقمة اذا كان من مزرعة نموذجية،عمره،اسم المزرعة او اسم صاحب الحيوان،عنوانة،الأمراض المشتبه بها والمراد إجراء فحص لتشخيصها،معلومات عن المعالجات وتاريخها.

ت-فحص العينة:

١-الفحص بالعين المجردة:توضع العينة تحت مصدر ضوئى وتفحص من حيث اللون والقوام والرائحة وباستعمال قضيب زجاجى وعدسة يد ويبحث عن المكونات غير الطبيعية التى قد يكون لها دلاله مرضية اهما الدم و

المخاط وعند الفحص المجهرى تختار عينة البراز الملاصقة لهذه التغيرات لأ نها تحوى أكبر عدد ممكن من الطفيليات إن وجدت ويجب الانتباه كذلك إلى وجود قطع الديدان الشريطية خاصة عند اللواحم والديدان الممسودة أو يرقات النغف عند الخيل.

٢-الفحص المجهري للبراز:

١-طريقة اللطخة المباشرة:

تستخدم هذه الطريقة عندالحيوانات الصغيرة مثل اللواحم أو الدواجن وعند الإنسان أو عندما تكون كمية البراز قليلة ،وذلك للكشف عن الأشكال البيضية والأشكال الناشطة او المتكيسه للأوالي.

١-توضع قطرة من المحلول الفيزيولوجي على شريحة زجاجية نظيفة.

٢-تؤخذ كمية قليلة من البراز بواسطة قضيب زجاجى من المنطقة التى تظهر عليها تغيرات ملحوظة بالعين المجردة،وتمزج جيداً بالمحلول الفيزيولوجى لتكون معلق شبه شفاف وتستبعد الأجزاء الكبيرة أو المواد غير المهضومة.

٣-تغطى العينة بساترة زجاجية نظيفة وتضغط جيداً حتى تلتصق بالعبنة وتفحص مجهرياً.

لتشخيص الإصابة بالإيميرية عند الدواجن النافقة أو المذبوحة تؤخذ العينة من المعى بعد استبعاد المحتويات وإجراء كشطة من الغشاء المخاطى وتوضع على شريحة زجاجية فى نقطة من محلول فيزيولوجى وتمزج جيداً ثم تغطى بساتره زجاجية وتفحص مجهرياً،وفى مثل هذه الحالة يمكن البرهان على المتقسمات او الكيسات البيضية أو مولدات الأعراس .

إن العيب الرئيسى فى هذه طريقة اللطخة المباشرة هو :أنه لا يمكن فحص الا جزء بسيط من البراز وذلك لأن المعلق يجب أن يكون رقيق جداً لتكون دراسته ممكنه.

٢-طريقة التعويم:

تعتمد هذه الطريقة على تحضير معلق للبراز فى محلول يتوسط وزنه النوعى بين البيوض والبقايا البرازية،حيث تطفو البيوض وتترسب البقايا البرازيةوتستخدم للكشف عن معظم بيوض الديدان الشريطية و الممسودةوبعض الديدان الكبديةومشوكات الرأس ،وعن أكياس الحيوانات ا لأوالي .

محاليل التعويم المستخدمة فى تشخيص بيوض الديدان الممسودة و الشريطية وكيسات الأوالي:

محلول ملح الطعام المشبع	وزنة النوعي ١،٢٠

محلول نترات الأمونيوم	١،٣
محلول نترات الصوديوم	١،٣٨-١،٤٠
محلول سلفات الزنك	١،٢٤
محلول السكر المركز	١،٢

محاليل التعويم المستخدمة في تشخيص بيوض الديدان المثقوبة:

محلول كلوريد الزنك	١،٥٠
محلول يودور الزئبق	١،٤٤

طريقة العمل:

١-يؤخذ حوالى (٣)غ من براز الحيوانات الصغيرة أو (٥)غ من براز الحيوانات الكبيرة من اماكن مختلفة من البرازوتوضع فى هاون بورسلان بواسطة ملعقة.

٢-تضاف كمية قليلة فى البداية من محلول التعويم فى الهاون ،وتفتت كمية البراز بالمقبض وتزاد كمية المحلول تدريجياً ويتم المزج والتحريك واضافة المحلول حتى تصبح الكمية بحدود (٣٠)مل.

٣-تتم تصفية المعلق عبر المصفاة فى أنابيب التثفيل وتملأ الأنابيب حتى مسافة(٠،٥سم) من قمتها .

٤-يتم تثفيل الأنابيب(٢-٣)دقائق بسرعة ١٥٠٠-٢٠٠٠دورة في الدقيقة .

٥-تؤخذ الغلالة السطحية فقط بواسطة لوب معدنى وتوضع على شريحة وتغطى بساترة وتفحص مجهرياً.

٦-إذا لم تتوفر مثفلة يتم ملأ أنابيب التثفيل بالمغلق كاملة حتى تتشكل حدبة صغيرة فوق قمة الأنابيب ثم توضع الساترات فوقها وتترك الأنابيب مستقرة فى الحامل(٥_٦٠دقيقة)ثم تؤخذ الساترات التى علقت عليها البيوض وتفحص مجهرياً .

٣-طريقة التعويم السكري :

تستخدم للكشف عن الكيسات البيضية للبوغيات الخفية وذلك كما يلي:

١-تمزج عينة البراز أو القشع فى محلول ثانى كرومات البوتاسيوم ٥، ٢%بنسبة ١:٤

٢-يتم تصفية المعلق عبر مصفات دقيقة وذلك لاستبعاد الأجزاء الكبيرة من البراز.

٣-يمزج معلق البراز أو القشع مع محلول التعويم السكرى المكون من :٥٠٠ غ

سكر+٣٢٠مل ماء+٦،٥غ فينول بنسبة ١:١٠في أنابيب التثفيل سعة١٥ مل .
٤-يتم تثفيل الأنابيب لمدة عشر دقائق بسرعة ٥٠٠-١٠٠٠دورة/دقيقة ثم تؤخذ الغلالة السطحية بواسطة لوب معدنى وتنقل إلى شريحة زجاجية وتغطى بساتره وتفحص مجهرياً.
ويمكن تمييز الكيسات من الخمائر بأن الكيسات تبدو كأجسام كروية مضيئة وفيها ١-٤حويصلات مظلمة.
٤-طريقة الترسيب :
تعتمد هذه الطريقة على غسل البراز عدة مرات لغسل البيوض عن معلق البراز وذلك باستخدام محاليل ذات وزن نوعى أقل من الوزن النوعى للبيوض وتستخدم لتشخيص الاصابة بالأمراض الطفيلية التى تطرح بيوض ذات وزن نوعي عالي مثل :
المتورقة الكبدية ،ديدان الكرش،منشقات الجسم،متفرعة المعى ،الكيسات البيضية للحيوانات الأوالي وخاصة الايميرية عند الخيل.
١-يؤخذ٥غ براز من مناطق مختلفة من الكتلة البرازية بواسطة ملعقة وتوضع في هاون بورسلان .
٢-يفتت البراز بمقبض الهاون ثم يضاف الماء تدريجياً بكميات مناسبة حتى يصبح معلق البراز متجانس تقريباً.
٣-يتم تصفية المعلق بواسطة مصفاة فى بيشر زجاجى ويضاف الماء حتى يصبح حتى يصبح الحجم ١٠٠ مل .
٤-يترك المعلق يرسب ويستقر فى البيشر الزجاجى لمدة ٣دقائق ثم يفرغ محتواه العلوى بحذر بحيث يبقى ارتفاع المعلق ١-٣سم فوق القاع وبهذه العملية يتم التخلص من الشوائب ومن بقايا البراز بكميات كبيرة لأنها تترسب بسرعة أقل من سرعة ترسب البيوض نظراً لخفتها .
٥-يضاف الماء إلى الوعاء ثانية حتى ١٠٠ مل.
٦-تكرر العملية ٤-٥ مرتين إلى ثلاث مرات لغسل معلق البراز حتى يصبح صافي تقريباً.
٧-يفرغ محتوى الوعاء الزجاجى العلوى للمرة الأخيرة ثم يؤخذ الجزء السفلي ويوضع دفعة واحدة فيطبق بتري مخطط أو على دفعات .
٨-تضاف عدة قطرات من الحبر أو محلول أزرق الميتيلين فوق محتوى طبق بترى ويمزج جيداً حيث تتلون البقايا البرازية بلون أزرق بينما تحتفظ البيوض بلونها وبحدودها الواضحة المحددة ثم تفحص مجهرياً.
٥-طريقة بيرمان فيتسل :
تستخدم هذه الطريقة للكشف عن اليرقات الأولى للديدان الرئوية أو

اليرقات الثالثة المعدية للديدان الممسودة من البراز.

مبدأ هذه الطريقة يعتمد على خاصية هجرة اليرقات نحو الرطوبة و الجاذبية الأرضية.

يتألف جهاز بيرمان من حامل معدنى ذو حلقة ،قمع بلاستيكى،مصفاة معدنية،انبوبة مطاطية بطول ١٠سم ،لاقط معدنى ،قطعة من الشاش ٢٥×٢٥ سم.

طريقة العمل :

١-نأخذ ١٠غ روث وتوضع فى قطعة من الشاش ثم تربط وتوضع في المصفاة .

٢-نملأ القمع بالماء الدافئ بدرجة ٣٧ درجة مئوية بحيث تغمر نصف العينة السفلي في المصفاة بعد وضع اللاقط.

٣-تترك العينة لمدة ٦ ساعات ثم بعدها نأخذ القطرات الأولى من الأنبوب المطاطي بفتح اللاقط بحذر وتوضع في طبق بتري .

٤-نفحص العينة تحت المجهر بتكبير×٤٠.

ملاحظة:يمكن تسخين وقتل اليرقات الحية بتسخينها بلطف على لهب ساخن.

٦-طريقة بيرمان المعدلة :

١-نأخذ ٣غ من عينة الروث ونضعها في قطعة من الشاش ثم تربط.

٢-نضع العينة فى أنبوب اختبار يحوى ماء دافئ بدرجة ٣٧ درجة مئوية ونتركها لمدة ٣-٦ ساعات .

٣-بعد مرور الزمن المراد يفحص الراسب مجهرياً.

٧-طريقة فايدا:

طريقة سهله وسريعة لكنها غير دقيقة النتائج وتستخدم عند المجترات الصغيرة لتشيص وجود اليرقات الأولى لديدان الرئوية.

طريقة العمل:

١-توضع بضع قطع من روث الأغنام ٤-٨قطع فى طبق بترى ثم يضاف كمية قلياة من الماء الدافئ.

٢-بعد ٣٠ دقيقة تزال كتل الروث ويفحص السائل تحت المجهر لرؤية اليرقات .

٨-طريقة ثيلمان :

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن بيوض الديدان المثقوبة وبيوض ديدان أخرى وكيسات بيض الايميرية.

١-يمزج (١-٢)غ براز في (١٠-٢٠)مل من المحلول المائي لحمض الخل ٥%.
٢-يترك المزيج لمدة نصف دقيقة حيث تترسب شوائب البراز الكبيرة .
٣-يسكب السائل العلوى فى أنبوب مثفلة سعة(٤٥)مل ثم يضاف إلية الايتر بنسبة ١:١.
٤-يرج الأنبوب جيداً ثم يثفل لمدة دقيقة واحدة بسرعة١٥٠٠ دورة /دقيقة .
٥-يتشكل فى الأنبوب أربع طبقات :الطبقة السطحية تحوى على الايتر و المواد الدهنية والأصبغة المنحلة فيه ،الطبقة الثانية والتى تحوى على الفضلات والتى غالباً ماتترسب على جدار الأنبوب بشكل حلقة،الطبقة الثالثة السائلة التى انحلت فيها الأملاح البرازية والمواد المخاطية،الطبقة الرابعة الراسبة تحتوي على البيوض .
٦-تحرر الطبقة الثانية ثم يقلب الأنبوب بسرعة للتخلص من الطبقة الثالثة ثم يضاف نقطه من المحلول الفيزيولوجى للراسب ويمزج به جيداً ثم تؤخذ عينة من المزيج للفحص المجهري .

استنبات يرقات الديدان الممسودة :

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن الاصابة بالديدان الممسودة أو للتفريق بين أجناس وأنواع هذه الديدان ،حيث إن أغلبية بيوضها متشابهه تحت المجهر ولانستطيع تمييزها عن بعضها إلا بتربية اليرقات إلى الطور اليرقى الثالث وتتطلب فترة تربيتها من يومين إلى خمسة عشر يوماً،بدرجة حرارة ٢٥ درجة مئوية .

طريقة العمل :
١-نأخذ (٢٠)غ من عينة البراز وتوضع فى طبق بترى ،ثم ترطب بشكل خفيف بإضافة الماء ،يغلق الغطاء بدون احكام للتهوية.
٢-نضع العينة فى مكان مظلم لمدة(٢-١٥)يوماً،بدرجة حرارة وسطية (٥ ٢)درجة مئوية
٣-نأخذ العينة ونضعها فى جهاز بيرمان فيتسل لمدة ٦ساعات ثم نأخذ القطرات الأولى منه وتفحص مجهرياً بتكبير×٤٠لرؤية اليرقات الثالثة.

الفحص الكمي للبراز :

تستخدم طريقة عد البيوض لتحديد شدة العدوى ومن أجل تقويم المعالجة المطبقة،لكنها قليلة الفائدة فى التشخيص المخبرى لأن عدد البيوض يختلف حسب نوع الديدان ،وعمرالاصابة ومقاومة الحيوان.

أ-طريقة ماك ماستر:

تستخدم هذه الطريقة عددبيوض الديدان الممسودةواليرقات والأكياس البيضية وخاصة الايميرية.

الأدوات اللازمة :

هاون بورسلان،خافض لسان خشبى،مصفاة ناعمة ،ماصة باستور ،محلول ملح الطعام المشبع،شريحة ماك ماستر وتتألف من شريحتين بينهما مسافة (٠،١٥)سم ويقسم الفراغ بينهما إلى غرفتين ،وعلى الشريحة العلوية مربعان مسطران مساحة كل منهما (١)سم٢ وغالباً ماتكون الشريحة العليا أضيق من السفلى بحيث تكون هناك مسافة قصيرة على الطبقة السفلى يمكن وضع قمة الماصة عليها أثناء ملء الشريحة.

١-يمزج ٢غ براز في ٣٠ مل محلول ملح الطعام المشبع .

٢-يتم تصفية المعلق عبر مصفاة ناعمة ومع التحريك المستمر للمعلق تملأ ماصة باستور.

٣-يتم ملء غرفتي الشريحة بسرعة حتى لاتطفو البيوض داخل الماصة .

تحصى البيوض ضمن المربعين مجهريا ويضرب المجموع ب (١٠٠)لينتج عدد البيوض في غرام براز .

ب- عدادة نيو بور المعدلة

تستخدم هذه الطريقة لتحديد عدد كيسات الحيوانات الأوالي في البراز.

1-يمزج 2 غ براز في 10 مل من محلول اليود المخفف بشكل جيد.

2-تنقل العينة بسرعة بواسطة ماصة باستور الى الشريحة المستخدمة فى عد كريات الدم عدادة نيو بور المعدلة .

3-يحصى عدد الكيسات الموجودة فى الجزء المقسم من الشريحة بنفس طريقة عد الكريات البيض .

4-تكرر العملية فى الفقرة الثالثة 3-4 مرات ويمثل المتوسط كمية الكيسات الموجودة فى 1\10 ملغ من البراز ولحساب عدد الكيسات فى الغرام يضرب الناتج ب١٠٠ فينتج لدينا عدد الكيسات الموجودة في (١)غ روث.

الفصل الثالث

طرائق فحص الدم

يستخدم فحص الدم لتشخيص الاصابة بالاوالى الطفيلية او بعض الديدان الخيطية اضافة الى دراسة الخواص الشكلية والفيزيائية والكيميائية للدم .

وتؤخذ انموذجات الدم من

١-الدم المحيطي

ويتم تحضيرة من الوريد الاذنى او نهاية الذيل .ويمتاز الدم المحيطى بما يلي

- سهولة الحصول عليه .
- عدم الحاجة الى مهارة في اخذ العينة الدموية .
- المحافظة على الصفات الفيزيولوجية لعناصر الدم .

٢-الدم الوريدي

ويؤخذ عادة حسب نوع الحيوان من

١-الوريد الوداجي: عند الخيل والابقار والجمال والاغنام والمعز .

٢-الوريد اللبني: عند الابقار الحلوب .

٣-الوريد الصافن: عند الكلاب والقطط .

٤-الوريد الاذني: عن الارانب والخنازير.

٥-وريد الجناح :عند الطيور .

ولكن فى بعض الاحيان يلزم جمع كمية مناسبة من الدم لفحصها بعد فترة ولحفظ هذه الكمية من التحليل تستخدم المواد المانعة للتخثر.

المواد المانعة للتخثر :

١-ملح Dipotassium Ethylene Diamine Tetra Acetate (E.D.T.A):

٢-مزيج أوكسالات الأمونيوم والبوتاسيوم

٣-سيترات الصوديوم الثلاثية

٤-الهيبارين

طرائق فحص الدم :

طريقة اللطاخة الرطبة :

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن خييطيات الديدان الخيطيةوالمثقبيات اذ توضع قطرة من الدم (وريدى او محيطى) والذى أضيف له مانع التخثر على شريحة زجاجية ،ثم تغطى بساترة وتفحص بالتكبير الضعيف والقوى وتكشف الطفيليات عن وجودها بتحريكها لكريات الدم الحمراء الموجودة بجوارها مباشرة ،وبعد فترة قصيرة تميل حركتها الشديدة إلى ابعاد الكريات الحمر عن المنطقة.وعندئذ يمكن رؤية الخييطيات أو المثقبيات نفسها وهى تتلوى وتتقلب.

طريقة اللطاخة الجافة الرقيقة:

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن طفيليات الدم مثل :البابيسية والثاليريا و

المثقبية.

١-تؤخذ قطرة دم بوخز رأس الذيل أو طرف الأذن بوساطة إبرة ،وتوضع مباشرة بجانب أحد طرفي الشريحة الزجاجية.

٢-توضع حافة شريحة زجاجية أخرى أمام قطرة الدم بزاوية ٤٥م وتسحب الشريحة قليلا الى الخلف حتى تلامس نقطة الدم التى تتوزع بانتظام تقريبا على حافتها الخلفية.

٣-تدفع الشريحة الزجاجية الثانية فوق الأولى إلى الأمام بحركة منتظمة وثابته بحيث يتشكل بعدها فيلم رقيق من الدم .

ملاحظة :

يمكن تلوين اللطاخة الدموية بإحدى الصبغات التالية:

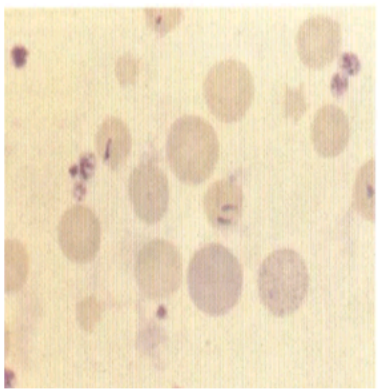
١-صبغة رايت

١-تغطى لطاخة الدم المثبته بالميتانول بقرابة نصف مل صبغة رايت لمدة دقيقو واحدة.

٢-يضاف إلى العينة مقدار مماثل من المحلول الدارئ ويمزج مع الصبغة بإمالة الشريحة من جانب لآخر مرات عدة أو بطريقة النفخ فى الفم ثم تترك لمدة٦ دقائق.

٣-تغسل الشريحة من المحلول الدارئ ثم تفحص مجهرياً.

هذه الصورة توضح طفيل الثايليريا



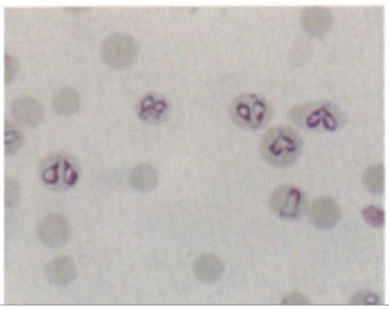
٢-صبغة ليشمان:

١-تغطى لطاخة الدم المثبته بالميتانول بقرابة نصف مل صبغة ليشمان لمدة (١-٢)دقيقة .

٢-يضاف إلى العينة مقدار مماثل من الماء المقطر ويمزج معه ويترك لمدة(٥-٨)دقائق.

٣-تغسل اللطاخة بالماء المقطر حتى تصبح بلون الزهر وتترك لتجف ثم تفحص مجهرياً.

هذه الصورة توضح بابيزيا بيجيمنيا متطفلة في كل فراغ الخلايا الدموية الحمراء (صبغ جيمسا)



هذه الصورة توضح الطفيل الأولي الانابلزما

طريقة اللطاخة الجافة السميكة:

تستخدم هذه الطريقة لتركيز طفيليات الدم فى بقعة صغيرة بعد تخريب كريام الدم وبقاء الطفيليات حرة.

١-توضع قطرة كبيرة من الدم فى وسط الشريحة الزجاجية وتحرك بقضيب زجاجي أو عود ثقاب مرات عدة على مساحة صغيرة.

٢-تجفف العينة فى الهواء لمدة ١٥ دقيقة ثم تصبغ مباشرة بصبغة جميزا الممدة دون تثبيت في الكحول لمدة نصف ساعة .

٣-تغسل الشريحة بلطف بالماء العادى حتى يختفى اللون من العينة ثم تجفف وتفحص مجهرياً.

اختبار هلامة الفورمول:

يستخدم هذا الاختبار لتشخيص الاصابة بالمثقبيات والليشمانية الدونافية .

طريقة العمل :

1- تملأ أنبوبة اختبار رفيعة ب (2)مل مصل , وتملأ أنبوبة اخرى ماء مقطر بالكمية نفسها.

2- تضاف نقطة أو نقطتان من محلول الفورمالين النقي تركيز 40 %
3- ترج الأنابيب جيدا" وتغلق بسدادة قطنية ثم تترك لمدة يوم واحد أويومين بدرجة حرارة 37 درجة مئوية .
4- تقرأ النتيجة على النحو التالي :
- إيجابية : ينقلب المصل إلى مادة هلامية معتمة تشبه بياض البيض المسلوق .
- سلبية:يحدث تصلب للمصل دون عتامة ,أو يبقى دون تغيير.

اختبار الفورمالين :

-يستخدم هذا الإختبار للكشف عن بعض الخيطيات فى الدم النازف من عقيدات أو النزيف الصيفي التي تسببها الإناث البالغة .

طريقة العمل :

1- يمدد (1)مل من الدم فى (10) مل فورمالين تركيز 2% فى أنبوب تثفيل .
2- يمزج الخليط جيدا" ثم يثفل لمدة (5-8)دقائق بسرعة (1500) دورة /دقيقة .
3- يسكب السائل العائم بقلب أنبوبة التثفيل بحركة واحدة .
4- يضاف إلى الراسب أزرق الميتيلين 0,1% بنسبة (1:1)ثم يمزج جيدا" ينقل بعض الراسب الملون إلى شريحة زجاجية للفحص المجهري.

أخطاء شائعة في تحضير لطخات الدم

1- عدم كتابة البيانات اللازمة على الشرائح .
2- فرش لطخة الدم فى غير مكانها من الشريحة أو أن يكون الدم فى العينة السميكة مفروشا" بشكل غير متساوى فى سماكته وذلك نتيجة عدم وضع الشريحة أفقيا" قبل جفافها.
3- أن تكون عينة الدم فى شريحة اللطخة الجافة السميكة مثبته نتيجة اختلاط الكحول بالدم أوتعرض الشريحة لضوء الشمس المباشر أوالحرارة الشديدة عند جفافها.
4- اختلاط الأوساخ من الجلد بالدم.
5- أخذ عينة الدم عللى شريحة غير نظيفة .
6- استعمال شريحة الفرش سبق أن استعملت دون أن تنظف حافتها من آثار العينة السابقة وذلك يؤدي إلى اختلاط عينات مختلفة.

تنظيف الشرائح المستعملة:

إذ أريد الاحتفاظ بالصبغة على الشريحة الايجابية بعد الفحص يجب إزالة زيت الفحص (زيت الأرز)من سطحها وذلك بغطسها بالزايلول أو بوضع بعض الزايلول لإزالة الزيت ,وتترك الشريحة بوضع أفقى حتى تجف , أوتمسح بقطعة من الشاش مشبعة بالزايلول.

- الشرائح المراد استعمالها لمرات أخرى فيتم غسلها وتنظيفها فى اناء يحتوى على كمية من الصابون الناعم المبشور حوالى 50غ لكل ليتر من الماء وهذه الكمية كافية لغسل حوالى (500) شريحة, يغلى الماء لمدة نصف ساعة بعد ذلك يترك ليبرد ثم تنظف الشرائح ليزال ما عليها من آثار صبغات ثم تغسل بالماء الجارى ثم توضع فى اناء يحوى ماء مقطر ثم تؤخذ وتنشف وتلف بورق نظيف وتحفظ لحين ا لاستعمال.

الفصل الرابع

التشخيص الزرعي

زرع الأوليات المعوية

المتحول الزحاري

يمكن استخدام المنبت التالي كليفيلاند وكوللير يتكون من :

آجار دفكو -ملح فيزيولوجي- طحين أرز – مصل حصان .

طريقة تحضيرة :

1- يذاب 33 غ من الآجار فى ليتر ماء مقطر ثم يوزع فى أنابيب اختبار ويعمل منه منحل ثم يعقم .

2- يغطى المحلول بمصل الحصان المخفف بنسبة 6:1 من محلول الملح الفيزيولوجي المعقم .
3- يضاف لكل أنبوبة 1|2 سم 3من طحين الأرز المعقم ثم تغطى وتوضع لمدة 48 ساعة في الحضانة للتأكد من عدم التلوث .

طريقة الزرع

1- تسخن الأنبوبة لدرجة 37 بوضعها في الحاضنة
2- تؤخذ كمية صغيرة من البراز أقل من 1|2 غ بواسطة لوب معدنى أو قضيب زجاجي ثم تمزج بالمنبت
3- تغطى الأنبوبة ثم توضع فى الحاضنة عل الدرجة 37 درجة مئوية لمدة يومان
4- تؤخذ عينة من قاع المزرعة وتفحص مجهريا"

الفصل الخامس

فحوصات مختلفة

الكشف عن المشعرة الجنينية الثلاثية

1- عند الأبقار :

- تحضر لطخات مباشرة من الافرازات المهبلية أو المواد الصديدية الموجودة في الرحم أو محتوى معدة الجنين ,أوالسائل المشيمي.

(تؤخذ السوائل قبل يومين أوبعد يومين من الشبق أو الاجهاض)

-تفحص مجهريا" ويمكن تلوينها بصبغة جيمسا

ب- عند الثيران :

-يتم الفحص عن المشعرات الجنينية بعد غسيل الغلفة على الشكل الآتي :

1- يتم اعطاء مهدئ للثور.

2- يقص الشعر حول الغلفة ثم تغسل المنطقة جيدا"بالماء الدافئ والصابون

3-يحقن محلول فيزيولوجى بواسطة قسطرة بلاستيكية مناسبة داخل

تجويف الغلفة.

1- تغلف فتحة الغلفة باليد اليسرى لمنع خروج المحلول الفيزيولوجى ثم تدلك المنطقة باليد اليمنى من الخارج وذلك لاجراء غسيل داخلي للغلفة.

2- يفرغ المحلول في وعاء زجاجي مناسب .

3- يثفل المحلول لمدة (5)دقائق بسرعة دوران 1500-2000 دورة|دقيقة

4- يتم التخلص من السائل العائم ,وتفحص قطرات من الراسب مجهريا"لرؤية المشعرات.

الكشف عن المثقبية الجنسية الخيلية :

1- تؤخذ العينات من إفرازات المهبل أوالقضيب أوالسوائل المرتشحة من الفرج .

2-تمدد العينات بإضافة المحلول الفيزيولوجى بدرجة 37 درجة مئوية بنسبة (2:1).

3-تنقل نقطة منه على شريحة زجاجية وتغطى بساترة وتفحص مجهريا" للكشف عن المثقبيات الحية .

4-يمكن تحضير لطخات وتثبت وتصبغ بطريقة رومانوفسكى وتفحص تحت المجهر .

الكشف عن الليشمانية الجلدية :

طريقة العمل:

١-تحضر لطخة مباشرة من محيط الآفة على شريحة زجاجية تحتوى على نقطة محلول فيزيولوجي ثم تجفف وتثبت وتلونبصبغة جيمسا.

٢-تفحص العينة بالعدسة الزيتية فتشاهد الليشمانية بشكل دائرى أو بيضاوى وتتلون النواة باللون الأحمر والهيولى باللون الأزرق وتحتوى على مولد السوط.

الكشف عن هامات الجرب

طريقة العمل:

١-يقص الصوف حول البؤرة المصابة.

٢-توضع قطرة من ماءات البوتاسيوم ١٠%على شريحة نظيفة أوقطرة زيت معدني أو غليسرين.

٣-تؤخذ العينة بعد تبليل المنطقة ويثبت الجلد بين السبابة الابهام وتكشط المنطقةبمشرط حتى ظهور تدمية بسيطةوتنقل القشور إلى الشريحة وتحرك مع ماءات البوتاسيوم بحركة دورانية.

٤-توضع الساترة بدون ضغط على الشريحة وتفحص بتكبير×٤٠ثم ١٠٠

الكشف عن الكيسات المذنبة البقرية:

تبدو الكيسات المذنبة مجهرياً على شكل حويصلات بيضوية رقيقة الجدار وممتلئة بسائل وتحتوي على رأس مقلوب ويحوي أربعة محاجم فقط.

يتم الحصول على عدة كيسات مذنبة من عضلات الأبقار وتوضع فى طبق بترى يحتوى على محلول مؤلف من :محلول فيزيولوجى مع محلول الصفراء الطازج لحيوانات ثديية بنسبة(١:١)وتترك فى المحم بدرجة حرارة (٣٠-١٤)درجة مئوية.

-إذا كانت اليرقات طازجة فخلال (١٠)دقائق تبدأ اليرقات بالاعتدال و الخروج من الكيسة المذنبة او قديمة يتم اعتدالها بصورة متأخرة واذا لم يتم اعتدال الرأس مع الرقبة خلال ساعة فهذا يدل على أن الكيسة ميتة.

الفصل السادس

حفظ العينات الطفيلية

كيسات البيض :

- تضاف كمية مناسبة من الماء إلى العينة وتحرك جيدا".
- يصفى الخليط بواسطة مصفاة شريط .
- تثفل الرشاحة لمدة |5|دقائق على سرعة 2500 دورة على الدقيقة .
- يضاف ثاني كرومات البوتاسيوم 2%إلى الراسب في طبق بتري .
- تحفظ الأطباق في البراد.

الديدان المثقوبة والملقوات :

تغسل العينة جيدا" بمحلول ملح فيزيولوجي 0,8-1%.

تثبت بالفورمالين 3-5 %أوبمحلول AFA (Alcohol+Formalin+Acetic acid) المسخنى لدرجة 60 -70 درجة مئوية.

الديدان الشريطية :

توضع القطع فى الماء وتترك فى البراد لمدة 4-12 ساعة وذلك لتلين الا شواك إذ من السهل تكسرها.

تثبت العينات بالفورمالين 5-10 %أو بمحلول . AFA

التثبيت

- لحفظ الديدان الكبيرة: نستخدم فورمالين 5-10%
- لحفظ الحشرات :نستخدم ايتانول 70%
  (كحول ايتيلي نقي 7 أجزاء +ماء مقطر 3 أجزاء)
- مثبت عام وخاصة للديدان الاسطوانية :كحول غليسرين
  (كحول ايتيلي 70%9 أجزاء +غليسرين جزء واحد)
- لحفظ الشريطيات :نستخدم حمض الخل الفورماليني الكحولي AFA

(فورمالين 40% 2 جزء +ايتانول 95% 5 أجزاء +غليسرين 2 جزء +حمض الخل الثلجي جزء واحد +ماء مقطر 40 جزء)

تحضير محضرات دائمة

1- تثبيت 2- غسيل 3- تحضير للصبغ 4-غسيل 5- صبغ 6- غسيل 7- نزع الصبغة 8-غسيل 9- نزع الماء 10- تصفية 11- اللصق.

الصبغ بصبغة هيماتوكسيلين الحديدى لهايدين :

1- الغسيل بالماء الجارى من 4-5 ساعات .
2- %4شبة الحديد 24 ساعة .
3- غسيل بالماء الجارى 4-24 ساعة.
4- غسيل بالماء المقطر ثلاث مرات 10-20 دقيقة.
5- صبغة مخففة1|2 ,1|3 24 ساعة.
6- غسيل بالماء الجارى طوال الليل .
7- شبة الحديد 2-3 % 3-24 ساعة حتى تصبح العينة السوداء بنية مصفرة .
8- غسيل بالماء الجارى
9- تمرير بالايتانول 70-80-85-90-95-99,5-100%لمدة 3-24 ساعة فى كل تركيز.
10- خليط من الايتانول مع كريوزوت 1:1 لمدة 24 ساعة.

11- الكريوزوت لمدة شهر
12- تلصق ببلسم كندا.

الفصل السابع:

الصبغات

جميع الصبغات العادية عبارة عن أملاح تتركب من شق حامضى وشق قلوي,
الصبغات الحامضية تصبغ عادة مكونات الخلية القاعدية(هيولى)بينما تصبغ الصبغات القاعدية مكونات الخلية الحامضية (الأحماض النووية),وعموما" ليتم صبغ الخلية بكاملها يجب استخدام نوعي (ليشمان ,جيمزا ,رايت)
-عند فحص عينة دم فيها طفيليات دموية تتلون هذه الطفيليات بألوان يسهل تشخيصها فنواة الطفيلى تتلون باللون الأحمر بينما تتلون الهيولى باللون الأزرق ,إضافة إلى تلون كريات الدم الحمراء و البيضاء وتصبح واضحة.

صبغة جيمزا

تتكون الصبغة من الايوزين وأزرق الميتيلين فى محلول من الكحول الميتيلي والغليسرين بالنسبة التالية :

5- بودرة جيمسا 3,8 غ
6- كحول ميتيلي 250 سم3
7- غليسرين 250 سم 3 .

طريقة التحضير :

١-توضع الصبغة(بودرة جيمسا)على ورقة نظيفة وتنقل إلى قارورة جافة سعتها٥٠٠سم٣ .

٢-نضيف ٢٥٠ سم٣ من الكحول الميتيلي إلى قارورة الصبغة.

٣-نضيف ٢٥٠سم٣ من الغليسرين إلى نفس القارورة التى وضعت فيها الصبغة والكحول.

٤-توضع القارورة التى تحوى الصبغة فى حمام مائى بدرجة(٥٥)درجة مئوية عدة ساعات وترج القارورة من وقت لآخر ،يمكن حفظ الصبغة لمدة سنتين

إذا حفظت جيداً بعيداً عن الرطوبة.
٥-عند الاستعمال تؤخذ الكمية اللازمة فقط وتخفف للاستعمال اللازم لنفس اليوم.

صبغة هيماتوكسيلين الحديدي لهايدين هاين
المحاليل الأساسية :
- صبغة الهيماتوكسيلين 1غ
- كحول 100% 20 مل .
- ماء مقطر 180 مل

التحضير:
- تحل الصبغة في الكحول ثم يضاف الماء المقطر.
- يترك المحلول في مكان بارد لمدة شهر حتى ينضج.
- يصفى المحلول قبل الاستعمال.

طريقة الصبغ :
- تخفف الصبغة بالماء المقطر 2|3 جزء
- تنقل العينة من الماء مباشرإلى الصبغة .
- تترك العينة في الصبغة ليلة كاملة.
- تستخدم شبة الحديد 2-4 %للصبغة الأولية .

شبة كارمن ماير
المواد الأساسية :
1- كارمن 2غ
2- شبة البوتاسيوم 5غ
3- ماء مقطر 100 مل

- تمزج المواد السابقة وتسخن على نار خفيفة لمدة 30 دقيقة ثم تغلى لمدة 30 دقيقة ثم تضاف نفس الكمية من الماء المقطر التي تبخرت .
- يبرد ويصفى المحلول
- يضاف 1غ من التايمور ليحمى المحلول من الفطور ثم يحفظ

طريقة الصنع
يصفى المحلول ثم يضاف جزء منه مع جزء او جزئين من الماء المقطر قبل الاستعمال .

يستعمل 3% حمض كلور الماء مع الايتانول 70% لأجل نزع الصبغة .
محلول لوغول
1- يود 1غ
2- يودور البوتاسيوم 2غ
3- ماء مقطر 100 مل
أولا"يحل يودور البوتاسيوم فى الماء ثم يحل اليود فى المحلول ويحفظ في زجاجات بنية بعيدا"عن الضوء .

نزع الصبغات :
تنزع الصبغة عند الحاجة بالكحول الحامضى تراقب العينة تحت المجهرحتى تصبح القشرة خالية من الصبغة تماما" بينما تبقى الأحشاء الداخلية مصبوغة .
يجب تغيير المحلول أذا أصبح لونه ورديا" قبل أن يصل لون العينة إلى اللون المطلوب .
إن عملية نزع الصبغة ستؤدي إلى تغيير لون العينه إلى اللون الأحمر.
الكحول الحامضى يتكون من :ايتانول 70 %99 جزء +حمض كلور الماء المركز 1 جزء.
يوقف نزع الصبغة بالغسيل الجيد في الايتانول ٧٠%.