الصبغة المقاومة للحامض The acid fast stain او Ziehl- Neelsen method

تعد هذه الطريقة من طرق التصبيغ التفريقي أن الهدف من استعمالها لتفريق البكتيريا المقاومة للحامض مثل بكتيريا ***Mycobacterium tuberculosis*** المسببة **للسل Tuberculosis** وبكتيريا ***Mycobacterium leprae*** المسببة **للجذام Leprosy** عن البكتيريا غير المقاومة للحامض.

تمكن كل من العالمين زيل **Ziehl** ونيلسون **Neelsen** سنة (1883 م) من التوصل إلى طريقة تم عن طريقها صبغ البكتيريا المسببة لمرض السل حيث يصعب صبغها بالطرق المعتادة وذلك لان جدارها الخلوي يحتوي على سلاسل طويلة من الاحماض الدهنية تسمى احماض **الميكوليك Mycolic acids** تجعل جدار الخلية لا تنفذ من خلاله معظم الأصباغ. تعد بكتيريا السل من أكثر البكتيريا الشائعة كمقاومه للحامض.

❖ المتطلبات REQUIREMENTS

- **الصبغة الأولية Primary stain :**

تحضر الصبغة بإذابة **50 غم** من الفينول **phenol** في **100 مل** من الإيثانول **ethanol** بتركيز **90%** أو الميثانول **methanol** بتركيز **95%** بعدها يتم اذابة **3** غم من صبغة الكاربول فوكسين **Carbol fucsin** في الخليط ، ثم يُضاف الماء المقطر لإكمال الحجم إلى **1 لتر**.

يتكون محلول إزالة اللون من كحول الايثانول بتركيز 95 وحامض الهيدروكلوريك **HCL** بتركيز **3%**.

- **الصبغة المضادة Counter stain :**

الصبغة المضادة هي ازرق المثيلين **methylene blue** بتركيز **0.3%** او اخضر المالاكايت **malachite green** بنفس التركيز.

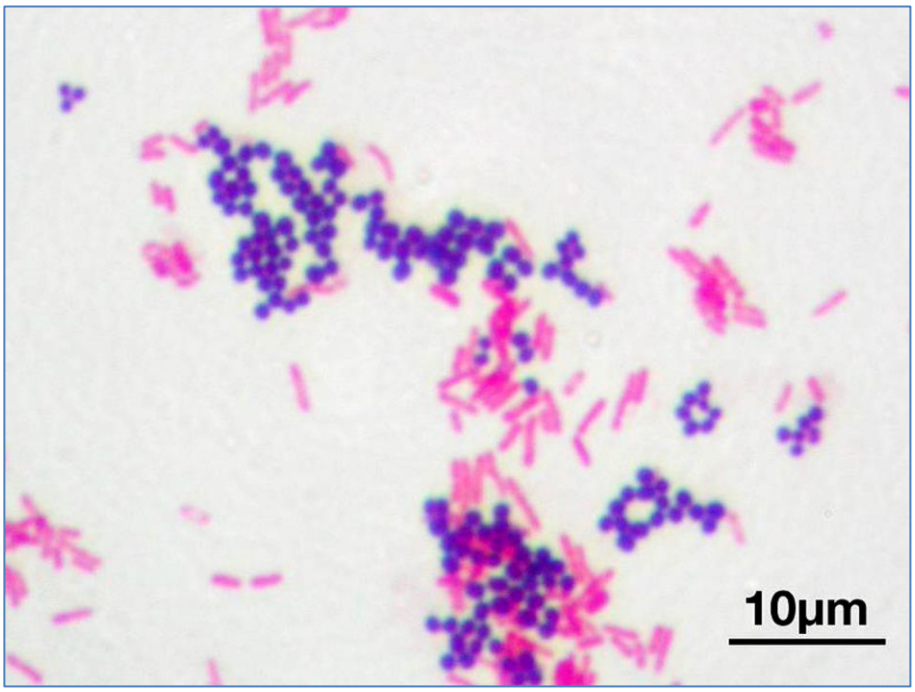
- **مبدا عمل الصبغة :**

تعتمد نظرية التصبيغ على استعمال محلول الكاربول فوكسين المحتوي على **5%** فينول حيث أن الكاربول فوكسين يذوب في الفينول أكثر من إذابته في الماء، أما الفينول فإنه يذوب في الدهون اكثر من إذابته في الحمض الكحولي لذلك فإن صيغة الكاربول فوكسين تكون لها قابلية للذوبان في الدهون أكثر من قابلية ذوبانها في خليط الحامض والكحول ، وبالتسخين يمكن تثبيت الصبغة المستعملة بشكل مناسب

ولهذا فإن جدار الخلية يحتفظ بالصبغة ولا يفقدها أثناء الغسيل. احماض الميكوليك **Mycolic acids** تجعل جدار الخلية لا تنفذ من خلاله معظم الأصباغ. لذلك حتي تدخل الصبغة الأولية الكاربول فوكسين نحتاج الى تسخين المسحة المغمورة بهذه الصبغة الى ان ينتج بخار بشرط عدم حدوث غليان ، التسخين يؤدي الى تمدد في جدار الخلية البكتيرية مما يسمح لصبغة الكاربول فوكسين بالدخول الى داخل الخلية البكتيرية فيذوب الفينول في الدهون وتصطبغ البكتيريا بالون الاحمر بعد ذلك نترك الشريحة المصبوغة لمده **5** دقائق لكي تبرد مما يسمح لجدار الخلية بالرجوع الى حالته الطبيعية وبذلك عند اضافه مزيل اللون لن يستطيع عبور جدار الخلية البكتيرية لإزالة الصبغة لذلك سميت هذه البكتيريا بالبكتيريا المقاومة للحامض.

- **طريقة العمل :**

1. تحضر مسحة من البكتيرية المراد صبغها ، تجفف المسحة بعدها تثبت بالحرارة.
2. ضع الشريحة على حامل ثلاثي الأرجل ثم اغمر المسحة بصبغة الكاربول فوكسين ثم حرك اللهب بهدوء على السطح السفلي للشريحة حتى تبدأ الصبغة بالتبخر ولا تتركها حتى الغليان ولا تجعل الصبغة تجف على الشريحة. كرر هذه العملية لمدة خمس دقائق مع إضافة الصبغة كلما تطلب ذلك. او يمكن وضع قطعة من ورق النشاف على المسحة ثم تغطيتها بصبغة الكاربول فوكسين ثم نضع الشريحة فوق حمام مائي يغلي ونتركه خمس دقائق دون جعل الصبغة تجف وإضافة الصبغة كلما لزم الأمر.
3. اترك الشريحة مدة من الزمن لتبرد ثم اغسل الشريحة بتيار مائي خفيف لغسل الصبغة.
4. اغسل الصبغة بالكحول الحامضي لمدة 15-20 ثانية.
5. اغسل المسحة تحت تيار مائي خفيف.
6. اصبغ المسحة بصبغة أزرق الميثيلين لمدة دقيقة.
7. اغسل الشريحة بالماء ثم جفف الشريحة.
8. افحص تحت العدسة الزيتية.
9. يلاحظ ظهور الخلايا المقاومة للحامض باللون الأحمر أما الخلايا غير المقاومة للحامض فتظهر باللون الأزرق.



الخلايا المقاومة للحامض تظهر باللون الأحمر اما الخلايا غير المقاومة فتظهر باللون الازرق

تصبيغ التراكيب Structural staining

1. تصبيغ المحفظة Capsule staining

بشكل عام تكون المحفظة **Capsule** غير ايونية **non- ionic** لذلك لا يمكن للصبغات القاعدية او الحامضية ان تلتصق بها ، يلجأ بذلك العاملين الى تصبيغ الخلية بالصبغات القاعدية أو تصبيغ ما يحيط بها بالصبغات الحامضية.

- **المواد والأدوات اللازمة :**

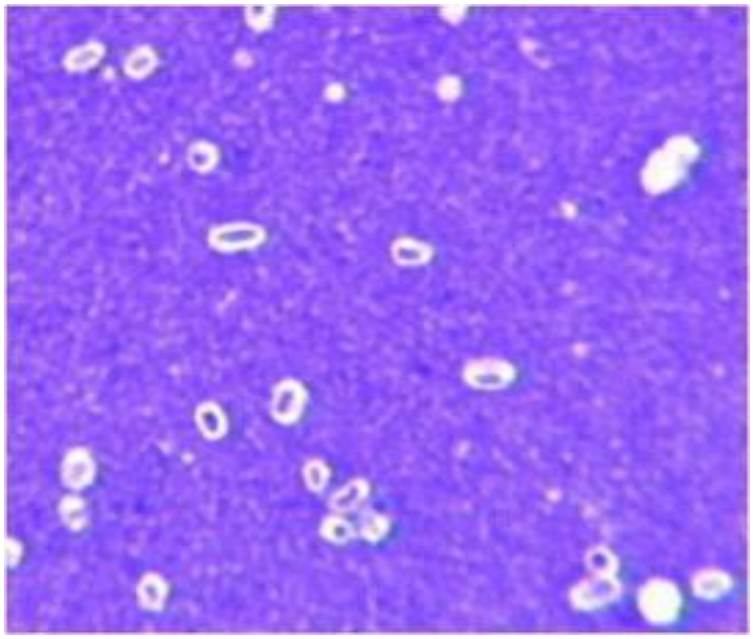
1. نماذج من البكتيريا بعمر 24 ساعة نامية في مرق الحليب **Skim milk broth**

(*Klebsiella pneumonia*, *Diplococcus pneumonia*)

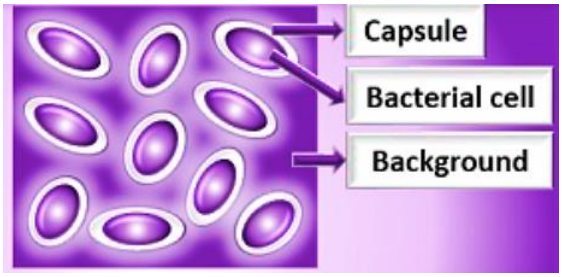
2. محلول صبغة البنفسج البلوري **Crystal violet** بتركيز **1%** .
3. محلول إزالة اللون **Decolorization solution** يتكون من محلول كبريتات النحاس **copper sulfate** بتركيز **20%** .
4. شرائح زجاجية ، ورق تنشيف ، عروة التلقيح .

- **خطوات العمل**

1. يتم تحضير مسحة smear من البكتيرية المراد صبغها.
2. دع المسحة تجف فقط بالهواء. لا يجوز تثبيت المسحة باستعمال الحرارة وذلك لان الحرارة سوف تسبب تقلص المحفظة أو إتلافها.
3. اغمر المسحة بصبغة البنفسج البلوري crystal violet لمدة دقيقتين.
4. اغسل الصبغة بلطف بمحلول كبريتات النحاس.
5. يتم تنشيف الشريحة باستعمال ورق التنشيف bibulous paper .
6. افحص تحت العدسة الزيتية oil immersion lens. سوف تظهر الخلايا البكتيرية والخلفية البروتينية بلون ببنفسجي بينما ستظهر المحفظة شفافة transparent.



الشكل أعلاه تبدو الخلايا والخلفية باللون البنفسجي
في حين تبدو المحفظة بشكل منطقة شفافة تحيط بالخلية



2. تصبيغ الابواغ الداخلية Endospores staining

- **المبدأ Principle :**

الابواغ الداخلية **Endospores** مقاومة بطبيعتها لتقبل الأصباغ ، لذا لا يمكن صبغها بالطرق العادية للصبغ مثل ابواغ الأنواع التابعة لجنس **Clostridium** او جنس **Bacillus** لذلك يجب تعريضها للحرارة العالية للسماح للصبغة الأولية بالتغلغل الى داخلها ويستعمل لذلك حمام مائي أو التعريض لحرارة اللهب.

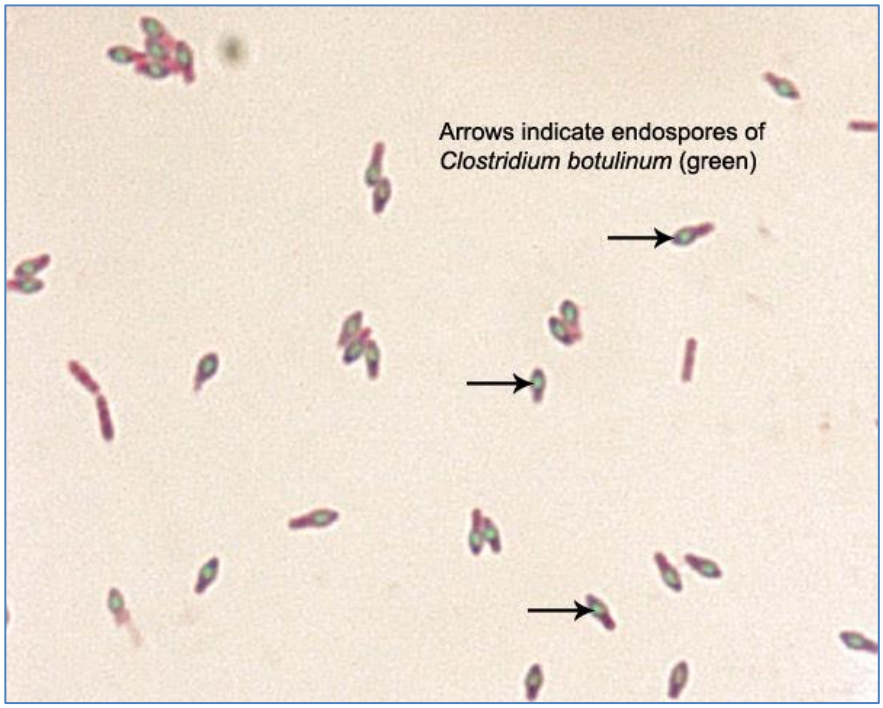
- **المواد والأدوات اللازمة :**

1. نماذج من الأنواع التابعة لجنس **Clostridium** او جنس **Bacillus**.
2. الصبغة الأولية **primary stain** وتتمثل بصبغة اخضر المالاكايت **malachite green**
3. الصبغة المضادة **counter stain** وتتمثل بصبغة السفرانين **safranin** .
4. شرائح زجاجية ، ورق تنشيف ، عروة التلقيح .

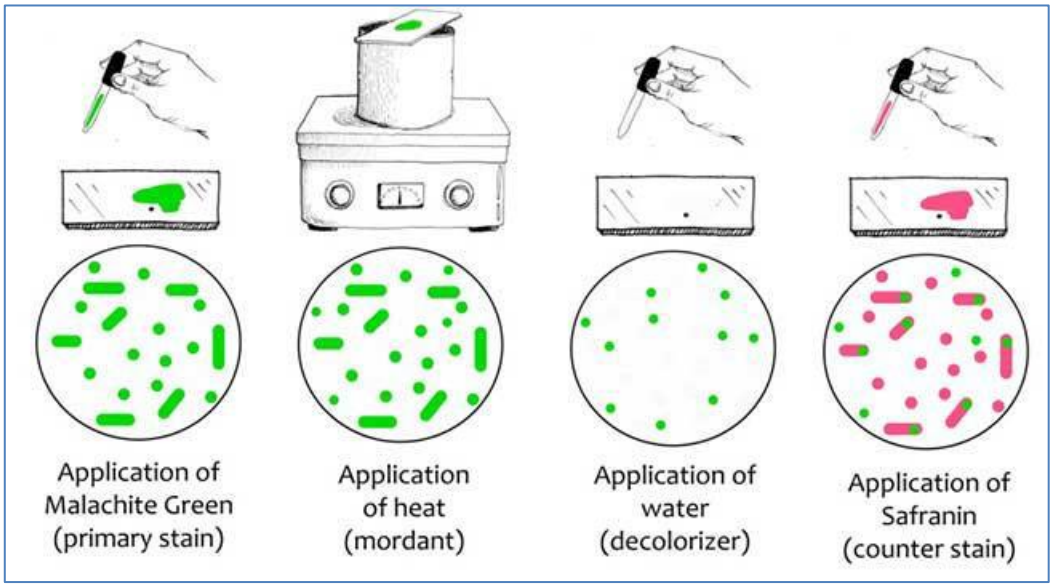
- **طريقة العمل :**

1. تحضر مسحة من مزرعة بكتيرية عمرها 48 ساعة. بعدها تثبت المسحة.
2. تغمر المسحة بصبغة **أخضر المالاكايت malachite green** وتسخن الشريحة بتعريض سطحها السفلي للهواء الساخن فوق اللهب لمدة 5 دقائق مع مراعاة عدم غليان الصبغة وعدم جفافها او يمكن وضع قطعة من ورق النشاف على المسحة ثم تغطيتها بصبغة أخضر المالاكايت ثم نضع الشريحة فوق حمام مائي يغلي ونتركه خمس دقائق دون جعل الصبغة تجف وإضافة الصبغة كلما لزم الأمر.
3. بعد ان تبرد الشريحة تغسل تحت تيار ماء خفيف.
4. تصبغ المسحة بصبغة **السفرانين safranin** لمدة دقيقة.
5. تغسل المسحة تحت تيار ماء خفيف ثم تترك لتجف ، ثم تفحص باستعمال العدسة الزيتية. تبدو الأبواغ الداخلية خضراء اللون في حين أن الخلايا الخضرية المتصلة بالبوغ تكون وردية اللون.

ملاحظة: تساعد الحرارة على تمدد جدار البوغ مما يساعد في دخول صبغة اخضر المالاكايت الى الداخل وعند تبريد المسحة يعود جدار البوغ لحالته الطبيعية وبذلك يبقى البوغ محتفظ بصبغة اخضر المالاكايت حتى بعد غسل المسحة بالماء ، في حين تصطبغ الخلية الخضرية باللون الوردي pink وهو لون الصبغة المضادة.



الشكل يوضح اللون الأخضر للأبواغ واللون الأحمر للخلايا الخضرية بعد التصبيغ



شكل توضيحي يوضح خطوات تصبيغ السبورات الداخلية Endospores