الفصل السابع

الفحوصات البكتيرية للبول

لا يحتوي بول الإنسان السوي على بكتيريا إذا ما تم جمع عينة البول بالشكل الصحيح وفي وعاء معقم. يعرف وجود البكتيريا في البول بالتبول البكتيري Bacteriuria، وهو مؤشر في بعض الأحيان على وجود التهاب في المجرى البولي. لذلك يتم فحص عينة البول بكتيريًا في حالة الشك بوجود التهاب في أحد أعضاء الجهاز البولي خاصة أن بعض المصابين بالتهاب المجرى البولي قد لا تظهر عليهم أعراض المرض، وأنه إذا لم يتم تشخيص الحالة وعلاجها مبكراً فقد يؤدي ذلك إلى تلف حاد لأنسجة الكلية في بعض الأحيان، ويتسبب فيما يسمى التبول البكتيري غير الأعراضي. كما أنه يجب القيام بفحص البول بكتيريًا للأشخاص المعرضين للإصابة بخطر التهاب المجرى البولي خاصة:

١- المرأة الحامل.

٢- المصابين بداء السكري.

٣- من له سجل سابق بالإصابة بالتهاب المجرى البولي.

ويشترط لجمع عينة البول لغرض الزراعة الآتي:

١- الامتناع عن تناول المضادات الحيوية لفترة ٣-٤ أيام من إعطاء العينة لتجنب النتائج السلبية الخاطئة.

٢- جمع البول في عبوة معقمة محكمة الإغلاق.

٣- تجمع العينة من منتصف البول من البول الصباحي.

٤- احضار عينة البول بعد جمعها مباشرة للمختبر؛ ليتم فحصها بفترة لا تزيد عن ساعة.

ويمكن الاستدلال على وجود البكتيريا بالبول من خلال الفحص المجهري للعينة وكذلك من خلال عمل مزرعة بكتيرية. ويتم الفحص المجهري بعد عمل ترسيب لعينة البول بالطرد المركزي بقوة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٣-٥ دقائق، حيث يفحص الراسب Deposit مجهريًا بعد تعليقه، فإذا تم مشاهدة ما معدله ٢٠ بكتيريا أو أكثر دل ذلك على وجود التهاب في المجرى البولي يلزم معها عمل مزرعة بكتيرية. عندها تعمل مزارع بكتيرية لعينة البول لتحديد نوع البكتيريا، وعمل فحص الحساسية للمضادات الحيوية، كما يمكن عمل مسحات من الراسب ثم تثبيتها بواسطة اللهب وصبغها بالصبغات التالية:

١- صبغة غرام Gram staining (صبغة روتينية).

٢- صبغة أزرق المثلين Methylene blue (تعمل أحيانًا).

٣- صبغة زيل نلسون Ziehl–Neelsen stain (تعمل أحيانًا).

صبغة غرام

تصبغ مسحات الرواسب البولية بصبغة غرام لهدف تحديد نوع البكتيريا (غرام موجب أو غرام سالب) وكذلك تحديد شكل الخلايا البكتيرية إن وجدت تبعاً للخطوات التالية:

١- تغطى الشريحة بمحلول البنفسج البلوري Crystal violet (٢٪) (مذاب في كحول مثيلي) لمدة دقيقة واحدة.

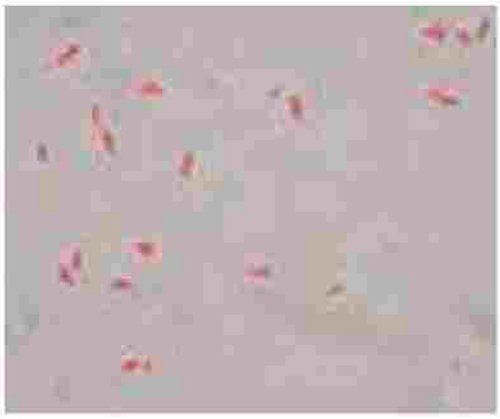
٢- تغسل الشريحة بالماء.

٣- تغطى الشريحة لمدة دقيقة بواسطة يود غرام (١ جم يود + ٢ جم يوديد البوتاسيوم + ٣٠٠سم^3 ماء مقطر).

٤- ينزع اللون بواسطة كحول إثيلي (٩٥٪) حتى يتوقف خروج اللون.

٥- تغطي الشريحة بواسطة صبغة السفرانين Safranin (١٪) (محلول مائي) لمدة ٣٠ ثانية.

٦- تغسل الشريحة ثم تجفف، وتفحص بواسطة المجهر باستخدام العدسة الزيتية (100x) ومن ثم يتم تحديد نزع البكتيريا إن وجدت سالب لغرام أم موجب لغرام (الشكل رقم ٤٨).



الشكل رقم (٤٨). صورة ضوئية لمسحة من راسب بولي بعد صبغها بصبغة غرام.

صبغة أزرق المثلين

محلول صبغة لوفلر القاعدية Loffler alkaline stain

أزرق مثلين مشبع (كحولي) (Methylene blue) ٣٠ سم^{٣}

هيدروكسيل البوتاسيوم (٠,٠١٪) ١٠٠ سم^{٣}

طريقة العمل

١- يتم عمل مسحة من راسب البول على شريحة نظيفة، ومن ثم تثبت بواسطة اللهب.

٢- تغطى الشريحة بمحلول صبغة لوفلر لمدة ٣ دقائق.

٣- يتم إزاحة الصبغة من على الشريحة بواسطة الماء.

٤- تجفف الشريحة ثم تفحص بواسطة العدسة الزيتية لتحري وجود البكتيريا.

صبغة زيل نلسون

تستخدم صبغة زيل نلسون Ziehl-Neelsen stain في حالة الشك بإصابة المجرى البولي بمرض السل، وعدم عزل الجرثومة بهذا الفحص لا يعني نفي وجودها.

محلول كربول الفوكسين

يخفف ١٠ سم^{٣} من محلول الفوكسين القاعدي Basic fuchsin الكحولي المشبع بواسطة ٩٠ سم^{٣} من محلول الفينول المائي (٥٪).

خطوات الصبغ

١- تحضر مسحة من راسب بول جمع خلال ٢٤ ساعة على شريحة نظيفة، ثم تثبت بواسطة اللهب.

٢- تغطى الشريحة بمحلول كربول الفوكسين، وتسخن بواسطة لهب هادىء لمدة ٥ دقائق حتى تبدأ الصبغة بالغليان.

٣- اغسل الشريحة بواسطة الماء الجاري، ثم غطي الشريحة بواسطة الكحول الحمضي Acid alcohol لمدة ٩٠ - ١٢٠ ثانية.

٤- تغسل الشريحة بالماء المقطر ثم تغطى بمحلول أزرق المثلين (صبغة معاكسة) لمدة دقيقة واحدة.

٥- تغسل الشريحة ثم تترك لتجف.

كما يمكن حقن الراسب البولي لراسب البول في خنازير غينيا جنبًا إلى جنب مع المزرعة الجرثومية الخاصة لعزل بكتيريا السل للتأكد من وجودها. وكانت تستعمل هذه الطريقة سابقًا.

لا يكفي فحص اللطخات البكتيرية المباشر لتحديد نوع البكتيريا وللتعرف الدقيق عليها فإنه لابد من عمل مزرعة جرثومية. ويجب أن يتم عمل المزرعة مباشرة حال وصول العينة إلى المختبر، شريطة أن تكون طازجة، ولم تتجاوز ساعة على خروجها من الجسم، وإذا تعذر ذلك، فإنه يجب أن تحفظ العينة بالثلاجة عند حرارة ٥°م، وأن يتم فحصها خلال ٢٤ ساعة. وفي كل الأحوال، فإنه يجب عدم إضافة أي مادة حافظة إلى العينة المراد فحصها جرثوميًا.

تعمل المزرعة البكتيرية لعينة البول على أوساط غذائية خاصة وبخاصة:

١- وسط آغار ماكونكي Mackonky agar medium.

٢- وسط آغار الدم Blood agar medium.

٣- وسط آغار Eosin Methylene Blue agar medium.

٤- وسط آغار Cystine Lactose Electrolyte Deficient agar medium.

ويتم عمل المزرعة الشبه تقديرية عن طريق التخطيط Streaking باستخدام إبرة تلقيح Loop (ذات قطر داخلي ٣ملم ١٠)، أو المسحة القطنية المعقمة Swab، أو طريقة الصب Pour plate، ثم تحضن أطباق بتري في الحاضن عند حرارة ٣٧°م لمدة ١٦ - ٢٤ ساعة (الشكلان رقما ٤٩ و٥٠). وفي اليوم التالي، إذا شوهدت مستعمرات بكتيريا على سطح الأطباق، فإنه يتم تحديد الجرثومة بواسطة استخدام الصبغات، مثل صبغة غرام، وكذلك الفحوصات الكيمياحيوية. ويمكن بعد تحديد الجرثومة المرضية تحديد المضاد الحيوي الفعال الذي يمكن استخدامه للمقاومة والقضاء على هذه البكتيريا من خلال اختبار مستعمرة مفردة ومسحها على سطح وسط غذائي من نوع آغار اختبار الحساسية Sensitivity agar medium، ومن ثم عمل فحص انسياب (انتشار) الأقراص Disk-diffusion test وهي الطريقة الأكثر استعمالاً في المختبرات التشخيصية لتحديد، نوع المضاد الحيوي الفعال، وتستخدم أقراص مختلفة من

مختبر لآخر. ويمكن استخدام أقراص المضادات الحيوية التالية لفحص حساسية الجراثيم التي يتم عزلها من عينة البول تبعًا لنوع البكتيريا:

١- سفراكسين Cefuroxine.

٢- كوترامكسزول Cotrimaxazole.

٣- حمض النلدكسيك Nalidixic acid.

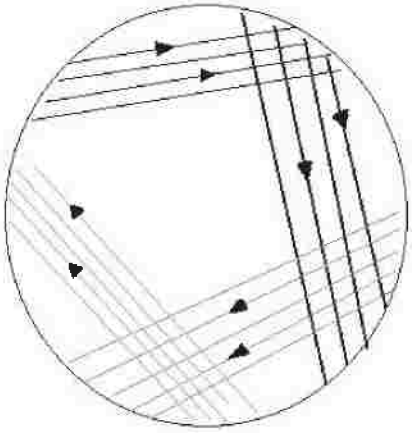
٤- نيتروفيرانتيون Nitrofurantion.

٥- الأمكسسلن Amoxicillin.

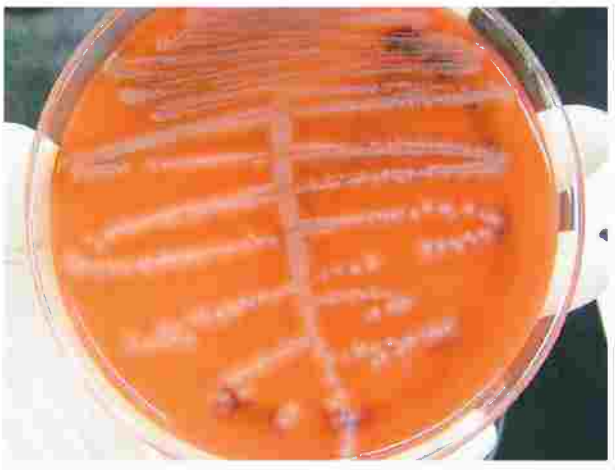
٦- السفرادين Cepheradine.

٧- السبروفلاكسين Ciprofloxacin.

٨- الكاربابنمس Carbapenems.



الشكل رقم (٤٩). رسم تخطيطي لطريقة عمل مزرعة لعينة البول بواسطة التخطيط المباشر.



الشكل رقم (٥٠). صورة ضوئية لمزرعة جرثومية لعينة البول تظهر مستعمرات جرثومية مفردة عن طريق التخطيط.

وعلى سبيل المثال، فعند عزل البكتيريا الموجبة لصبغة غرام من عينة البول، فإنه يتم اختبار المضادات الحيوية التالية:

١- أمكسسلن Amoxicillin.

٢- مثسلن Methicillin.

٣- نافسلن Nafcillin.

٤- كلوكساسلن Cloxacillin.

٥- فلوكلوكساسلن Flucloxacillin.

وتجدر الإشارة إلى أنه يمكن تشخيص الالتهاب بالمكورات العنقودية في مرحلة مبكرة وبدرجة كبيرة في عينات البول المأخوذة في بعض حالات التهاب الإحليل عند الرجال، لكن ذلك أصعب بكثير عند النساء؛ بسبب احتمالية متزايدة لتلوثها.

وأفضل عينة لفحص البول بكتيريًا هي العينة الصباحية ؛ حيث يكون البول قد مكث فترة طويلة بالمثانة البولية. وفي حالات الإصابة بالتهاب المجرى البولي فقد يصل عدد البكتيريا حتى ١٠٠ ألف/ سم^{٣} إلا في حالات، خاصة كأن يتعاطى المريض مضادات حيوية أو لم يعط البول فرصة للمكوث فترة طويلة في المثانة.

هنالك مؤشرات على وجود البكتيريا بالبول، مثل احتواء البول على النيتريت، حيث إنها تتكون في البول في حالة التهاب المجرى البولي، حيث تعمل البكتيريا على تحويل النترات الذي نتناوله بالغذاء إلى نيتريت. كما يعطي الأس الهيدروجيني للبول مؤشرًا على نوع البكتيريا في البول في حالات الالتهابات البكتيرية. فبكتيريا الإشريكية القولونية *E. coli* توجد في البول الحمضي، بينما توجد بكتيريا بروتيس *Proteus* في البول القاعدي ؛ لأنها تحول اليوريا إلى أمونيا. وفيما يلي بعض الفحوصات الكيميائية التي يمكن أن تساعد نتائجها على الحكم بوجود البكتيريا في عينة البول :

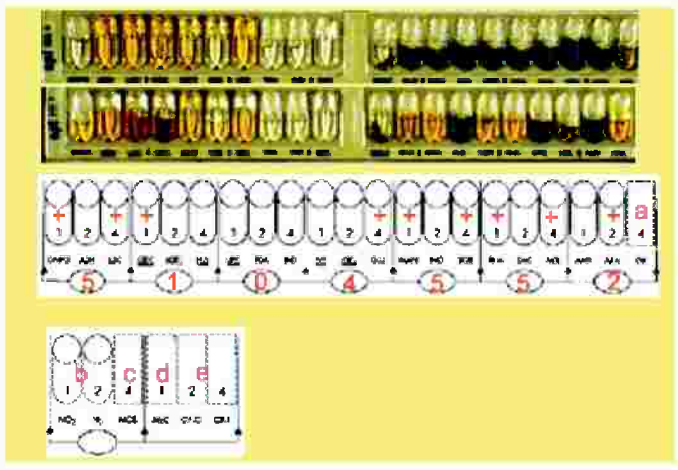
١- تحويل النترات إلى نيتريت، ويجرى معه دائمًا الكشف عن وجود كريات الدم البيضاء أو استرازها Leukocytes estrase.

٢- نشاط بعض الإنزيمات.

٣- فحص استهلاك الجلوكوز، ولا ستخدم هذا الفحص روتينيًا.

٤- فحص اختزال كلوريد ثلاثي فنيل رباعي الزوليم Triphenyl tetrazolium chloride.

وغالبًا ما تجرى هذه الاختبارات في المختبرات التشخيصية على عتائد متوفرة تجاريًا وتمكن من إجراء عدد كبير منها بسرعة ودقة، مثل أجهزة الفهرس المرتسم التحليلي (Analytical Index-API) وتساعد على تعيين هوية العديد من أنواع البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (الشكل رقم ٥١). ولا تقوم أي من هذه الطرائق بأي حال من الأحوال مقام المزرعة البكتيرية، حيث تُعد نتائجها فاصلة.



الشكل رقم (٥١). صورة ضوئية تظهر التحليل في الفهرس المرتسم التحليلي الذي يساعد على تعـــيين هوية العديد من أنواع البكتيريا.

فحص الحساسية للمضادات الحيوية

يتم هذا الفحص تبعًا للخطوات التالية:

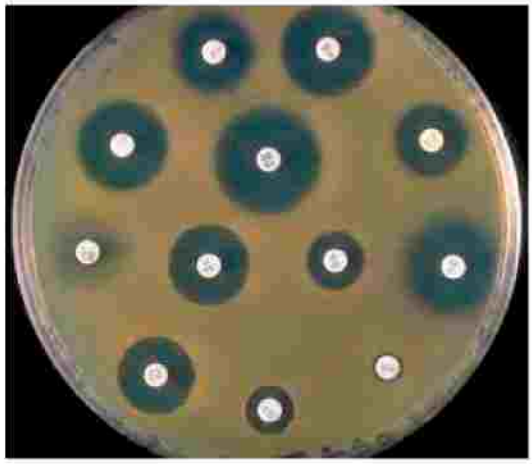
١- تؤخذ مزرعة مفردة من البكتيريا، ويعمل منها معلق Suspension في ماء معقم.

٢- يصب المعلق، ويمسح بشكل متجانس على سطح الآغار.

٣- تغرس أقراص المضادات الحيوية على سطح الآغار، وهي أقراص ورقية مشربة بالمضادات الحيوية بتركيز مقارب للمستوى الذي يبلغه العقار بالدم أو البول.

٤- تحضن الأطباق لمدة ٢٤ ساعة.

٥- يتم تحديد أفضل مضاد حيوي من خلال تحديد مساحة التثبيط Inhibition zone حول أقراص المضادات الحيوية (الشكل رقم ٥٢).



الشكل رقم (٥٢). صورة ضوئية تظهر فحص انسياب الأقراص لتحديد المضاد الحساس.

كما تجدر الإشارة إلى طريقة ستوكس (Stoke's method)، وذلك بزرع الجزء الخارجي من الطبق ببكتيريا معيارية لنوع البكتيريا سواءً كانت موجبة أو سالبة لغرام، ومن ثم تقارن المناطق المثبطة والمحيطة بالأقراص التي أظهرتها البكتيريا المراد فحص الحساسية للمضادات الحيوية لها مع البكتيريا المعيارية.

كما تجدر الإشارة إلى أنه إضافة لما سبق هنالك طرائق أخرى مثل فحص E-test، حيث تستخدم به الأشرطة بدل الأقراص، وكذلك فحص بالآلات.