الاختبارات الكيموحيوية (Biochemical Tests)

يمكن تصنيف الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص البكتريا إلى مجموعتين رئيسيتين هما: أنظمة التوصيف المايكروبي التقليدية، وأنظمة التوصيف المايكروبي التجارية. إن برامج التوصيف المايكروبي ليست موحدة في جميع المختبرات، فهي تختلف من مختبر لآخر بسبب تعدد الخيارات، وحجم وخبرة الكادر الفني للمختبر، فضلاً عن التكاليف. بشكل عام، تعتمد معظم المختبرات على كلا النوعين من أنظمة التوصيف المايكروبي التقليدية والتجارية.

أولاً: أنظمة التوصيف المايكروبي التقليدية (Conventional Microbial Identification Systems)

أ. الاختبارات السريعة أحادية الأنزيم (Single-Enzyme Rapid Tests)

الاختبارات السريعة أحادية الأنزيم هي مجموعة من الاختبارات التي تك شف عن وجود أو عدم وجود أنزيم واحد أو تفاعل كيموحيوي خلال ثواني إلى دقائق. هذه الاختبارات غير مكلفة إلى حد ما، وسهلة الأداء، وغالباً ما توفر معلومات أولية مهمة يتم استخدامها لتحديد الخطوات اللاحقة في برنامج التوصيف المايكروبي. يمكن استخدام هذه الاختبارات لتحديد الهوية المفترضة لبعض الكائنات المجهرية على مستوى الجنس أو حتى على مستوى الأنواع. فعلى سبيل المثال، يمكن أن يحدد اختبار أنزيم الكتاليز الموجب للمكورات الموجبة لصبغة گرام كونها مكورات عنقودية *Staphylococci*، كما أن الفحص الموجب لاختبار تجلط الدم يحدد ما إذا كانت المكورات الموجبة لفحص أنزيم الكتاليز هي مكورات عنقودية ذهبية *Staphylococcus aureus*.

1. الكشف عن إنزيم الاوكسيديز Oxidase Test

تلعب إنزيمات الـ Oxidase دوراً هاماً في نقل الإلكترونات خلال التنفس الهوائي. إن إنزيم Cytochrome Oxidase يسرع عملية أكسدة Cytochrome (المختزل) بوساطة الأوكسجين الجزيئي (O_2) لينتج عن هذه العملية تكوين H_2O أو H_2O_2 أي أن البكتريا التي تمتلك أنزيم Cytochrome Oxidase هي موجبة للاختبار. البكتريا الهوائية واللاهوائية الاختيارية المحبة للكميات القليلة من الهواء Microaerophilic تكون منتجة لهذا الأنزيم. يستخدم هذا الاختبار في تمييز جنسي *Pseudomonas* و *Neisseria* الموجبة للاختبار عن أفراد العائلة المعوية السالبة له.

يعتمد هذا الاختبار على إنتاج أنزيم Cytochrome Oxidase من قبل كائنات حية تحتوي على مركب Cytochrome C الذي يشترك في سلسلة نقل الإلكترونات. هذا الأنزيم بوجود الأوكسجين يؤكسد كاشف (tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride) الوردي 1% ليكون مركبات الاندوفينول الأرجوانية الداكنة.

ولإجراء هذا الاختبار هناك طريقتان: الأولى مباشرة من خلال إضافة قطرة أو قطرتين من محلول الصبغة الكاشفة مباشرة على المستعمرة النامية في الطبق وملاحظة تكون اللون البنفسجي دلالة عل النتيجة الموجبة. أما الطريقة الثانية فهي طريقة ورق الترشيح، حيث يتم تشبيع ورق الترشيح بالكاشف ثم تجفيف الورق. بعدها تنقل مستعمرة تم تنميتها على وسط صلب Tryptic Soy Agar من البكتريا المراد فحصها بوساطة عيدان خشبية وتوضع على ورق الترشيح المشبع بالكاشف، والانتظار لمدة (10–30) ثانية، إن تغير لون الكاشف إلى الأرجواني الداكن يعني أن البكتريا موجبة لفحص أنزيم الأوكسيديز، أما بقاء

لون الكاشف على حاله فهذا يعني أن الفحص سالب. إن نقل المستعمرات بوساطة الناقل المعدني (Loop) الذي يحتوي على الحديد قد يعطي فحصـــاً موجباً كاذباً، وقد تكون البكتريا مو ضوع الفحص سالبة لفحص أنزيم الأوكسيديز. كما أنه لا يمكن فحص المســـتعمرات التي تنمو على الأوســـاط الانتقائية أو التفريقية التي تحتوي على الكلوكوز، لأن التخمير الذي يحصل في هذه الأوساط يمنع نشاط هذا الأنزيم مما يؤدي إلى نتائج سلبية خاطئة.

2. الكشف عن أنزيم الكتاليز Catalase Test:

أنزيم الكتاليز هو الأنزيم الموجود في نظام التنفس الهوائي ضمن سلسلة نقل الإلكترونات والمسؤول عن تحلل بيروكسيد الهيدروجين المتكون أثناء التنفس الهوائي. كل الكائنات الحية التي تستخدم المسار الهوائي في التنفس تعطي فحصاً موجباً لأنزيم الكتاليز عند الاختبار، أما الكائنات الحية التي تســـتخدم مســـارات أخرى غير المسار الهوائي فيكون فحصها سالباً لأنزيم الكتاليز.

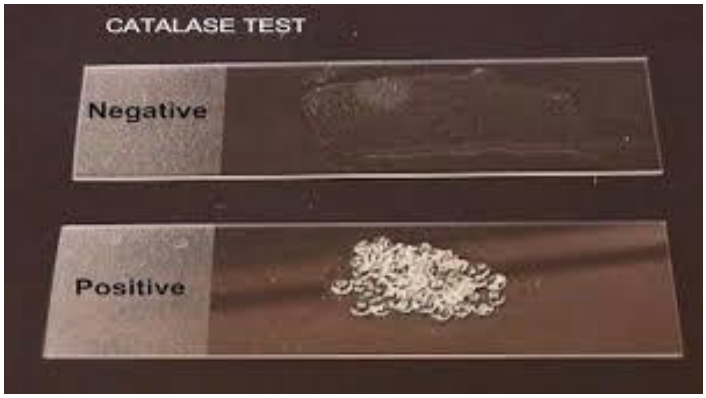
إن وجود أنزيم الكتاليز يســـاعد في تمييز العنقوديات *Staphylococci* (التي تعطي اختباراً موجباً) عن المســـبحيات *Streptococci* والتي تعطي نتيجة سالبة له. كما أنه يساعد في توصيف العديد من أنواع البكتريا الأخرى. حيث أن

أنزيم Catalase يحلل بيروك سيد الهيدروجين إلى ماء وأوك سجين (غاز) حـ سب المعادلة التالية:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2$$

وجود هذا الأنزيم مهم جداً للنمو الهوائي لأنه يمنع تراكم المواد السامة التي قد تقتل البكتريا. يمكن أن يجرى هذا الاختبار بثلاث طرائق:

1. طريقة الـ شريحة الزجاجية: حيث يو ضع جزء من الم ستعمرة الجرثومية على شريحة زجاجية ثم تـ ضاف إليها قطرة من محلول 3% H_2O_2 وفي الحالات الم شكوك فيها يتم النظر إليها بو ساطة العد سة الـ شيئية 4x، كما يمكن أن تغطى الشريحة الزجاجية بغطاء الشريحة cover slide من أجل مشاهدة فقاعات الأوكسجين.
2. طريقة تقطير المستعمرة: إن المستعمرات الجرثومية يمكن اختبارها مباشرة في الطبق الزرعي عن طريق إضـــافة قطرة من محلول 3% H_2O_2 فوق المستعمرة مباشرة وملاحظة خروج فقاعات (النتيجة موجبة).
3. طريقة الانبوب الشـــعري: وتتم من خلال غمر الأنبوب الشـــعري بمحلول 3% H_2O_2 ثم و ضعه على الم ستعمرة الجرثومية حيث يلاحظ في النتائج الموجبة ارتفاع الفقاعات الهوائية في الأنبوب الشـــعري ويعد هذا الاختبار من الاختبارات السريعة الحساسة.



ملاحظة: لا يمكن ا ستخدام و سط أگار الدم في هذا الاختبار وذلك لأن كريات الدم الحمر تحتوي على أنزيم Catalase وبالتالي فقد تعطي اختباراً موجباً كاذباً.

3. اختبار أنزيم التجلط Coagulase test:

أنزيم Coagulase هو أنزيم ثابت حرارياً وينتج بـ شكل أ سا سي من قبل *Staphylococcus aureus* ويســـتخدم للتمييز بين المكورات العنقودية الذهبية والمكورات العنقودية الأخرى. إن اختبار أنزيم التجلط على الـ شريحة يک شف عن وجود أو عدم وجود عامل التخثر الذي يعمل مباشـــرة على الفايبرينوجين في البلازما ويسبب تكتل البكتريا. نتائج اختبارات تخثر الدم في الشريحة تتوافق بنسبة 96% تقريباً مع نتائج اختبار تخثر الدم في الأنبوب. إن البكتريا الموجبة لفحص أنزيم التجلط تكون كتلاً خلال 10 ثواني، بينما البكتريا الســـالبة لهذا الفحص تبقى بشكل أحادي دون تكتلات.

يعد هذا الاختبار من أهم الاختبارات لتـ شخيص المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*. حيث يســـتهدف هذا الأنزيم مادة موجودة في الدم تدعى البروثرومبين، والمعقد الناتج من هذا التفاعل يدعى Staphylothrombin والذي يؤدي إلى تخثر الدم وذلك بتحويل الفايبرينوجين إلى فايبرين. بشـــكل عام فإن المكورات العنقودية الذهبية تمتلك ما يسمى بالـ ــ Clumping factor والذي يطلق عليه أحياناً Slide Coagulase الذي يكشـــف عنه بملاحظة تكتل البكتريا عند إضـــافة قطرة من بلازما الدم على الشـــريحة ومزجها مع قطرة من عالق البكتريا. تجدر الإشارة إلى أن أنزيم Coagulase يوجد أيضاً في أنواع أخرى من المكورات العنقودية مثل *S. intermedius* و *S. hyicus*، لكن هذه الأنواع من المكورات العنقودية عزلات سريرية نادرة. ويمكن إجراء هذا الاختبار بطريقتين:

1. طريقة الـ شريحة الزجاجية: با ستخدام ما صة معقمة يتم و ضع قطرة من المحلول الملحي الفسيولوجي على شريحة زجاجية. ثم يتم مزج مـ ستعمرة إلى مـ ستعمرتين من البكتريا مو ضوع الفحص في قطرة المحلول الملحي لتجهيز ها للفحص. بعد ها يتم وضـــع قطرة من بلازما دم الأرنب على الـ شريحة ومزجها لبـ ضع ثواني، فإذا كانت الفحص موجباً سوف نلاحظ تكتل البكتريا في غضون 10 ثواني.
2. طريقة الأنبوبة: وتتم بأخذ أنبوبة معقمة، يو ضع فيها 0.1 سم^3 من العالق الســـائل للمكورات العنقودية الذهبية، ويمزج مع 0.5 ســـم^3 من بلازما دم الأرنب أو الإنـ سان، وتو ضع الأنبوبة في حمام مائي بدرجة حرارة 37° لمدة تزيد عن أربع ســـاعات وتفحص خلال هذه الفترة فإذا كان الفحص موجباً فإن بلازما الدم سوف تتخثر، وعكس ذلك هو الفحص السالب.

ملاحظة مهمة:

Plasma = Blood – (RBC + WBC + Platelets)

Serum = Blood – (Fibrinogen + RBC + WBC + Platelets)

وللحصـــول على بلازما الدم يتم ســـحب عينة من دم الأرنب أو الإنســـان ووضعه في أنبوبة معقمة حاوية على مادة مانعة للتخثر (Anti-Coagulant) مثل الهيبارين أو أوكزالات الصوديوم أو البوتاسيوم. وللتخلص من الجزء الخلوي للدم يتم ترسيب الدم بعملية الطرد المركزي (Centrifugation) بسرعة 1000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، حيث سيترسب الجزء الخلوي في أسفل الأنبوبة، في حين أن سائل البلازما الأصفر الحاوي على الفايبرينوجين سوف يكون في الأعلى.