ثانياً: أنظمة التوصـــيف المايكروبي التجارية Commercial Microbial Identification Systems

هناك العديد من الطرائق والإجراءات العملية التي يمكن أن تســـتخدم لأغراض التشـــخيص منها: التصـــبيغ ودراســـة المظهر الخارجي للمســـتعمرة، والحركة، والعديد من التفاعلات الكيموحيوية. إن دراسة كل هذه الخواص تتطلب كميات كبيرة من الأوساط الزرعية والأطباق وأنابيب الاختبار، إضافة إلى الفترة الزمنية اللازمة لدراسة هذه الخواص. ولتلافي كل هذا الجهد والوقت والتكاليف تم ابتكار العديد من الأنظمة السريعة لتشخيص البكتريا التي تعزل باستمرار في المختبرات الطبية تشخيصاً دقيقاً وخلال فترة قصيرة جداً. إن لهذه الأنظمة العديد من المزايا وهي:

1. اقتصادية من ناحية الأوساط الزرعية.
2. سهولة العمل.
3. الدقة في التشخيص.
4. سريعة.
5. نتائج منتظمة وكاملة.

هذه المزايا ساعدت في انتشار واسع في استخدامها خاصة في المختبرات الطبية. وبالرغم من ذلك فإن الطرق الروتينية قد لا يســـتغنى عنها خاصـــة عند الحاجة إلى تأكيد بعض الاختبارات المشكوك في نتائجها إضافة إلى أن الأنظمة السريعة قد صممت لتشخيص الأجناس البكتيرية ذات الأهمية الطبية بشكل أكبر من أنواع البكتريا الأخرى مثل البكتريا الرمية في التربة والمياه.

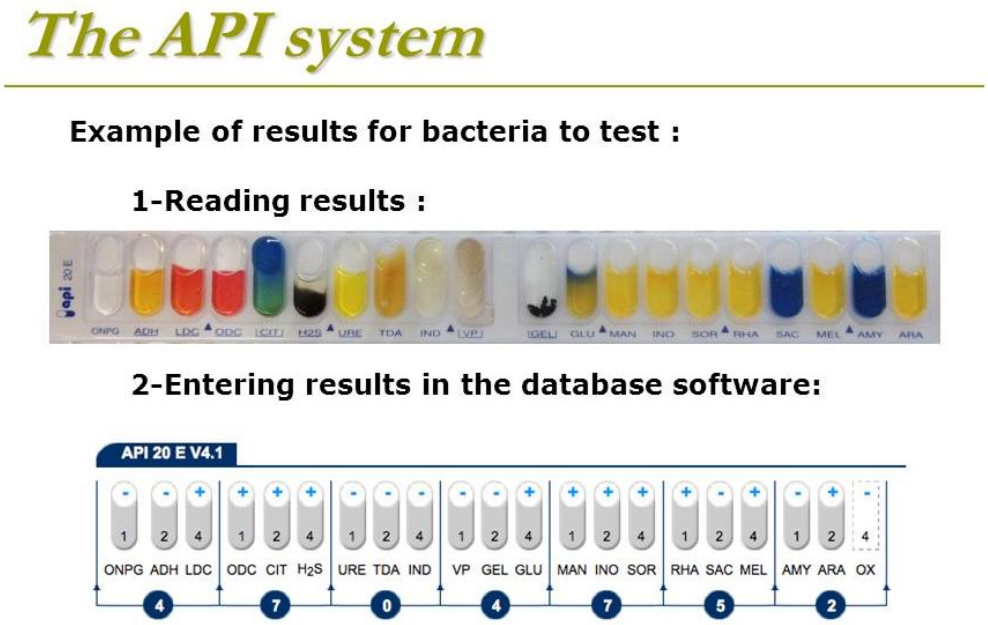
التشخيص باستخدام نظام API (Analytical Profile Index)

يعد التشخيص بنظام API من التقنيات الحديثة والمعتمدة حالياً بشكل واسع في مختبرات الأحياء المجهرية لتـ شخيص مختلف أنواع الجراثيم. إن هذه الطريقة توفر الجهد والوقت اللازم لأداء الاختبارات الكيموحيوية التقليدية السـابقة الذكر التي تجرى بـشكل منفـصل، وذلك لأنها تعتمد على أطقم Kits جاهزة تحتوي على عوامل كيمياوية محددة يتم تحـ ضيرها مـ سبقاً ومن ثم تجميعها في حفر منفـ صلة وبـ شكل شريط بلا ستيكي شفاف وهي تعتمد في أدائها بـ شكل رئيـ سي على الاختبارات الكيموحيوية التقليدية. ومن أ شهر أنواع هذا الاختبار هو API 20 E والخاص بتمييز أجناس وأنواع العائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*).

شريط API 20 E هو عبارة عن شريط بلاستيكي يحتوي على 20 حفرة صغيرة بشكل اسطواني ذات فتحة علوية، تحوي هذه الحفر على الأوساط الزرعية مع الكواشف للاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية حيث يجرى في كل حفرة اختبار كيموحيوي واحد، يأتي مع كل شريط حاوية بلاستيكية يوضع فيها الشريط تحوي في جزئها السـفلي على حفر دائرية صـغيرة يتم ملؤها بالماء قبل إجراء الاختبار وذلك لتوفير نوع من الرطوبة أثناء حضن الشريط، ويجهز مع كل شريط أيضاً أنبوبة تحوي على وسط سائل خاص بالشريط، ودليل أرقام يحدد من خلاله جنس العزلة البكتيرية ونوعها.

عمل الشـريط: يتم من خلال التعليمات الواردة في الدليل المجهز من قبل الـ شركة المنتجة لهذا الـ شريط. وقبل البدء بإعداد هذا الـ شريط يجب إجراء اختبار أنزيم الأوكسـيديز على العزلة قيد التشـخيص حيث يعد هذا الاختبار جزءاً من المجموعة الأخيرة، أي أنه الاختبار رقم 21. تتضـمن طريقة العمل تلقيح العزلة البكتيرية المجهولة في الأنبوبة التي تحوي الو سط الـ سائل الخاص بهذا الـ شريط

(Suspension media) بواســـطة الناقل ومقارنة عكارة الأنبوبة بعكارة أنبوبة ماكفرلاند الخاصة بها، فلكل نوع من أنواع هذا الاختبار درجة عكارة خاصة به. (مع العلم أن محلول ماكفرلاند يحضر بإذابة كلوريد الباريوم في حامض الكبريتيك المركز بنســـب متدرجة لعمل أنابيب ماكفرلاند الخاصـــة بكل درجة من درجات العكارة). بعد ذلك يتم تلقيح كل حفرة بالو سط الخاص بال شريط والذي لقحت فيه البكتريا المراد معرفتها بواسطة المغزل (micropipette) وإغلاق حاوية الشريط ووضعه في الحاضنة بدرجة حرارة 37° مئوي لمدة 24 ساعة، بعدها يتم إخراج الشريط من الحاضنة وتضاف قطرة من الكواشف الخاصة بكل فحص والانتظار لعدة دقائق، حيث يتم الاستدلال على إيجابية وسلبية كل اختبار من خلال التغيرات اللونية التي تحصل بعد الحضن وإضافة الكواشف.



قراءة الشـــريط تتم وفق الدليل المرفق مع الاختبار حيث أن الاختبارات الكيموحيوية في الشـــريط مقســـمة إلى ســـبع مجاميع كل مجموعة تحوي ثلاثة اختبارات مرقمة في الأســـفل بالأرقام 1، 2، 4 على التوالي. فالاختبار الأول في المجموعة يأخذ الرقم 1 والاختبار الثاني يأخذ الرقم 2 والاختبار الثالث يأخذ الرقم

4 فإذا كانت نتيجة التفاعل موجبة للاختبار يعطى الرقم الذي في أسفله أما الاختبار الذي يكون تفاعله سالباً يعطى الرقم صفر، بعد ذلك تجمع أرقام كل مجموعة مع بعضها للحصول على سبعة أرقام، ثم تقارن النتيجة مع الأرقام الموجودة في دليل الأرقام المجهز من قبل الشـــركة المنتجة لهذا الشـــريط لمعرفة جنس البكتريا ونوعها. أو تتم القراءة آلياً باســـتخدام جهاز يدعى قارئ شـــريط API (API Strips Reader)، الذي يحتوي على معلومات مبرمجة حول تصنيف البكتريا مما يسهل إعطاء النتيجة بشكل سريع ودقيق.

اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحياتية Antibiotic Sensitivity Test

إن العديد من الأحياء المجهرية المســـببة للأمراض في الإنســـان والحيوان تظهر مقاومة وا ضحة لتأثير الم ضادات الحياتية الم ستخدمة في علاج الحالات المرضـــية مما يؤدي إلى طول فترة العلاج وتدهور الصـــحة. وللتغلب على هذه المعوقات يذ صح دائماً بإجراء فحص حـ سا سية الأحياء المجهرية (الم سببة للحالة المرضية) للمضادات الحياتية. حيث أن الفائدة المرجوة من هذا الاختبار هو معرفة المضـــاد الحيوي الأكثر فاعلية في القضـــاء على المســـبب المرضـــي، ومعرفة المضادات الحيوية غير الفعالة ضد المسبب المرضي موضوع الاختبار الذي يكون مقاوماً لها، وذلك لا ستبعادها من العلاج وا ستبدالها بم ضادات ذات فاعلية عالية لتقليل فترة العلاج والقضاء على المسبب المرضي بأقصر فترة ممكنة. في بعض الأحيان تكون نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية غير مقنعة حيث يستعمل الم ضاد الذي أثبت كفاءة عالية ضد الجراثيم المعزولة في المختبر من المر ضية ولكن المصـــاب لا يســـتجيب للعلاج بهذه المضـــادات، وتعزى هذه ربما إلى أن الجراثيم المعزولة قد لا تكون هي ذات الجراثيم المسببة للحالة المرضية، وفي هذه الحالة يجب إجراء العزل مرة ثانية للجراثيم ذات العلاقة بالحالة المرضية.

إن حساسية الجراثيم لمختلف المضادات الحيوية يمكن تقديرها باختبارات عديدة وهي:

1. اختبار التخفيف في الأنابيب Tube dilution test

تجرى تخافيف ثنائية متعاقبة للمضاد الحيوي في وسط زرعي سائل في أنابيب صغيرة معقمة (الوسط الزرعي المفضل هو Mueller Hinton broth) تلقح بالبكتريا المراد فحصها. قبل ذلك يتم تحضير أنبوبة سيطرة حاوية على العالق البكتيري في الوسط الزرعي بدون إضافة المضاد الحيوي. تحضن جميع هذه الأنابيب بضمنها أنبوبة السيطرة لمدة 16–20 ساعة، ثم بعد ذلك يتم تقدير فعالية المضاد الحيوي بالاعتماد على وجود أو عدم وجود العكارة حيث تحدد أنبوبة الاختبار التي تحتوي على أعلى تخفيف من المضاد الحيوي المثبط لنمو المسبب المرضي (عدم وجود عكارة) ويعتبر التركيز الأدنى المثبط للنمو Minimum Inhibitory Concentration (MIC). يمكن القول بأن الحضانة لفترة 18–24 ساعة يمكن التعرف من خلالها على التركيز الذي يثبط النمو ولكن قد لا يكون قاتلاً لأن استمرار النمو لفترة 48–72 ساعة أو أكثر قد يلاحظ في نهايته أن المسبب المرضي لم يقتل في نفس التركيز بل قد يحتاج الأمر إلى التركيز الأعلى من المضاد الحيوي. إن اختبار التخفيف في الأنابيب يبين إن كان المضاد الحيوي موقفاً لنمو البكتريا (Bacteriostatic) أو قاتلاً للبكتريا (Bacteriocidal).

2. اختبار التخافيف في الأگار Agar dilution test

يتم إجراء التخافيف المتعاقبة serial dilution للمضاد الحيوي في الوسط الزرعي الصلب، وبذلك يكون كل طبق حاوي على تخفيف معين ثم تلقح سطوح الأطباق بالبكتريا المراد فحص حساسيتها بواسطة المغزل (micropipette) في نقطة واحدة دون الذشر، أو يستخدم جهاز تلقيح خاص يقوم بتلقيح عدة أنواع من

المزارع البكتيرية على طبق واحد، وبعد الحضن لمدة 12–16 ساعة تقرأ النتيجة حيث يكون التركيز الأدنى من المضـــاد الحيوي (أعلى تخفيف لا يســـمح بنمو المستعمرات) هو التركيز الأدنى المثبط MIC.

3. طريقة انتشار الأقراص Disc diffusion test

إن هذه الطريقة من أكثر طرائق فحص الحساسية شيوعاً لكونها بسيطة وسريعة واقتصادية، وتسمى هذه الطريقة أيضاً بـ (Kirby Bauer method). تتضمن هذه الطريقة استعمال أقراص ورقية مشبعة بالمضاد الحيوي حيث توضع هذه الطريقة على سطح الأگار الذي يحتوي على العالق البكتيري. تكون الأقراص على نوعين إما مفردة (unidisc) والتي تكون منفصـــلة عن بعضـــها، أو متعددة (multidisc) متصلة مع بعضها. تشبع مسحة قطنية في مزرعة سائلة ذات كثافة مناســـبة من العالق البكتيري تمت مقارنتها مســـبقاً بأنبوبة ماكفرلاند ذات العيارية 0.05 ثم تضغط المسحة القطنية على جدار الأنبوب للتخلص من السائل الفائض. بعدها يمسح سطح طبق الأگار بالمسحة القطنية المشبعة مع تدوير الطبق مرتين أو ثلاثة للتأكد من نشر العالق البكتيري على كامل سطح الأگار ثم يترك الطبق لمدة 15 دقيقة للسماح بامتصاص العالق البكتيري. بعد ذلك يستعمل ملقط معقم بواسطة الكحول والتلهيب لوضـــع الأقراص المفردة أو المتعددة على ســـطح الأگار، ويتم الضغط على القرص بعد وضعه بشكل خفيف لضمان تماسه الكامل مع السطح ويترك لمدة 15 دقيقة. تحضن الأطباق بدرجة حرارة 37° مئوي لمدة 18 ساعة ثم تقرأ النتيجة عن طريق قياس هالة تثبيط النمو حول كل قرص من أقراص المضادات الحياتية بواسطة المسطرة، وتكون النتائج كالآتي:

م: (مقاومة) قطر هالة التثبيط بضمنها قطر قرص المضاد الحيوي أقل من 10 ملم.

+: قطر هالة التثبيط بضمنها قطر قرص المضاد الحيوي من 11–15 ملم.

++: قطر هالة التثبيط بضمنها قطر قرص المضاد الحيوي من 16–25 ملم.

+++: قطر هالة التثبيط بضمنها قطر قرص المضاد الحيوي من 26–35 ملم.

هناك بعض العوامل التي تؤثر على نتائج هذا الاختبار منها: عمق الأگار، والأس الهيدروجيني للو سط، ومـ صدر الو سط، وعمر وعكارة العالق البكتيري، وطريقة الذ شر، والحرارة، وطريقة قراءة النتائج، ومحتوى القرص من المـ ضاد الحيوي.