Biochemical test of Bacteria

الاختبارات التشخيصية الكيموحيوية للبكتريا

لغرض تشخيص العزلات الجرثومية التي يتم الحصول عليها بعد زرع العينات المأخوذة من أماكن مختلفة من جسم المرضى يجب إجراء سلسلة من الاختبارات الكيموحيوية التي عن طريقها يتم التمييز بين جنس وأخر وحتى بين نوع و أخر لذا تعد هذه الاختبارات إشارة لما يمكن أن يتواجد في الإصابات وهذا يسهل اختيار العلاج الملائم لها بعد إجراء الحساسية الدوائية للجراثيم .

اختبارات IMViC

عائلة Enterobacteriaceae أو Enteric bacteria هي جراثيم سالبة لصبغة كرام تستوطن القناة المعوية للإنسان أو الحيوانات الأخرى ، وتستخدم مجموعة اختبارات IMViC للتميز بين أفراد هذه العائلة التي تتضمن العديد من الجراثيم منها *Escherichia coli* ، *Enterobacter* و *Klebsiella* . ويؤشر وجود جرثومة *E.coli* من قبل منظمات الصحة العامة كدليل على التلوث ألبرازي Fecal Contamination للأغذية ومياه الشرب بينما وجود *Enterobacter* و *Klebsiella* التي تتشابه مع *E.coli* في تخمير سكر اللاكتوز لا يشير بالضرورة إلى التلوث ألبرازي لأنها تنتشر بشكل واسع في التربة والحشائش ، اختبارات IMViC يمكن أن تستخدم للتفريق بين هذه الأنواع الثلاث .

IMViC هو اختصار لاختبارات Indole ، Methyl red ، Voges – Proskauer و Citrate للحصول على نتائج هذه الاختبارات تستخدم ثلاث انابيب تحقن بالعزلات المراد تشخيصها احدها يحوي مرق التربتون tryptone broth (لاختبار الاندول) والأخر يحوي مرق المثيل الأحمر MR-VP broth (لاختباري MR-VP) والثالث يحوي أكار Simmon's citrate (لاختبار السترات) .

* اختبار الاندول Indole test :

يعد هذا الاختبار من أهم الاختبارات للتفريق بين الأجناس المعوية الثلاث *Escherichia coli* ، *Enterobacter* و *Klebsiella* ويعتمد على قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم Tryptophanase الذي يحطم الحامض الاميني Tryptophane لينتج مادة الاندول وحامض البايروفيت والامونيا ، تحقن الجرثومة المراد تشخيصها في وسط tryptone broth الغني بحامض التربتوفان وتترك لمدة 24 – 48 ساعة تحت درجة حرارة 37 ْم وبعد الحضن يضاف كاشف ايرلخ الذي استعيض عنه حاليا بكاشف كوفاكس Kovac's (P-dimethyl aminobenzyldehyde) إلى الوسط فيظهر لون قرمزي كحلقة على سطح الأنبوبة ولا يجب أن تطول فترة الحضن لان الحامض المنتج من قبل البكتريا يثبط نموها وكذلك يحطم حلقة الاندول تعطي *E.coli* نتيجة ايجابية لهذا الاختبار بينما لا تمتلك *Enterobacter* و *Klebsiella* القدرة على إنتاج إنزيم tryptophanase .

***اختباري المثيل الأحمر وفوكس بروس كاور Methyl red – Voges - Proskauer tests :

يقرأن هذان الاختباران بنفس الأنبوبة التي تحوي مرق MR-VP إذ تحقن الجرثومة المراد تشخيصها في المرق لمدة 48 ساعة ثم تقسم المزرعة النامية على أنبوبتين احدهما لاختبار المثيل الأحمر والأخرى لاختبار فوكس بروس كاور ، يحوي الوسط على الكلوكوز والببتون ، كل الجراثيم المعوية تؤكسد سكر الكلوكوز

للحصول على الطاقة ، لكن الناتج النهائي يختلف تبعا لفعاليتها الإنزيمية ، ويستخدم اختباري MR-VP للكشف عن الناتج النهائي لتخمر سكر الكلوكوز .

تنتج جرثومة *E.coli* لونا من التخمر يدعى بتخمر الأحماض الخليط Mixed acid fermentation إذ تنتج مجموعة من الأحماض العضوية من تخمر سكر الكلوكوز (الخليك – الفورميك – السكسنيك – اللاكتيك) وهذا يسبب خفض الأس الهيدروجيني إلى ما دون 4.4 لذا عند إضافة دليل المثيل الأحمر Methyl red سينتج لون احمر كرزي (نتيجة ايجابية) بينما لا تتمكنان جرثومتي *Enterobacter* و *Klebsiella* من إنتاج الأحماض وإنما تنتج مواد أكثر قاعدية مثل (Ethyl alcohol و Acetyl methyl carbinol أو ما يدعى Acetoin) الذي يرفع pH الوسط إلى ما يقارب 6.2 فيتحول لون الدليل إلى الأصفر (نتيجة سلبية) .

ويستخدم كاشف باريت Barritt's reagent لاختبار VP ويتكون من جزأين (A و B) وهما α-naphthol و KOH (40%) إذ يضاف 0.6 مل من A و 0.2 مل من B إلى 0.1 مل من المزرعة الجرثومية وعند تكون اللون الأحمر الغامق فذلك دليل على إنتاج مادة Acetoin في الوسط ، يأخذ ظهور اللون مدة 20 – 30 دقيقة ويكون هذا الاختبار موجبا مع *Enterobacter* و *Klebsiella* وسالبا لجرثومة *E.coli* .

****** اختبار استهلاك السترات Citrate utilization :**

لكثير من الأحياء المجهرية القابلية على استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون لذا استخدمت هذه الخاصية في تشخيص العديد من الجراثيم من بينها الأنواع العصوية السالبة لصبغة كرام .

يستخدم لهذا الاختبار وسط يدعى Simmon's citrate نسبتا إلى العالم Simmon الذي اكتشفه يحوي هذا الوسط على مادة السترات كمادة أساس لإنزيم citrate lyase أو citrate aldolase الذي يجزأ السترات إلى oxaloacetate الذي يفقد بدوره ذرة كاربون ليتحول إلى pyrovate و CO_2 يتحد CO_2 الفائض مع الصوديوم والماء مكونا كاربونات الصوديوم القاعدية التي تغير لون دليل Bromothymol blue من اللون الأخضر في الوسط الحامضي أو المتعادل إلى الأزرق الغامق في الوسط القاعدي وقد يتحد الصوديوم مع الهيدروكسيل لينتج هيدروكسيد الصوديوم مما يزيد الوسط قاعدية ، يصب الوسط بشكل مائل slant ويحضن بعد طعنه بالجرثومة لمدة 48 ساعة بدرجة 37 ْم وتقرأ النتائج بعدها .

يكون هذا الاختبار موجبا مع *Enterobacter* و *Klebsiella* وسالبا لجرثومة *E.coli* .

لذا فمجمل هذه الاختبارات كالآتي :

الاختبار / العزلة	Indole	Methyl red	Voges - Proskauer	Citrate
E.coli	+	+	-	-
Klebsiella	-	-	+	+
Enterobacter	-	-	+	+

اختبار إنتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S production test :

يستخدم هذا الاختبار للتميز بين أفراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae إذ تكون الجراثيم قادرة على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S من المركبات العضوية الموجودة في مادة الببتون Peptone مثل الأحماض الامينية الحاوية على الكبريت كالسستين Cysteine والسستاين Cystine والمركبات الكبريتية غير العضوية التي تضاف إلى الوسط ألزرعي .

ويسمى الإنزيم القادر على إنتاج غاز H_2S بإنزيم Desulfohydrase أو Cysteinase . وتستخدم أوساط شائعة لانجاز هذا الاختبار منها :

وسط Triple Sugar Iron agar (TSI) : يستخدم هذا الوسط روتينياً لتمييز الجراثيم المعوية enteric bacteria ويستخدم أيضاً للتميز بين عائلة Enterobacteriaceae والجراثيم العصوية السالبة لصبغة كرام المعوية الأخرى بواسطة القدرة على استخدام السكريات (الكلوكوز ، اللاكتوز ، السكروز) وتحرير الكبريت من كبريتات الحديد الامونياكية أو ثايوسلفات الصوديوم ، يحوي الوسط على 1 % من تركيزه سكر اللاكتوز و السكروز و 0.1 % سكر الكلوكوز . ويستخدم الفينول الأحمر phenol red ككاشف الدالة الحامضية ويستدل بواسطته على تكوين الأحماض الناتجة من تخمر السكريات . يطعن الوسط المائل بالجرثومة المراد تشخيصها ويخطط سطحه بشكل متعرج بإبرة الطعن ويحضن الوسط لمدة 18 – 24 ساعة بدرجة حرارة 37 ْم لغرض الكشف عن وجود كبرتيد الهيدروجين وتخمر السكريات وإنتاج الغاز ويمكن أن نحصل على نتائج مختلفة كالتالي :

1- Yellow Butt and red slant : قعر اصفر والسطح المائل احمر تبعا لتخمر سكر الكلوكوز (يتحول لون الفينول الأحمر إلى الأصفر نتيجة تكون الحامض في قعر الأنبوبة) (حامضي ، Acid) ويبقى السطح المائل احمر (قاعدي ، Alkaline) بسبب قلة تواجد الكلوكوز في السطح لذا يكون تواجد الحامض محدد بالقعر .

2- Yellow Butt and slant : تبعا لتخمر سكر اللاكتوز و / أو السكروز (نتيجة لتواجد هذا السكر بتركيز عالي وبذا يكون إنتاج الحامض عالي لذا يكون السطح والقعر أصفران) .

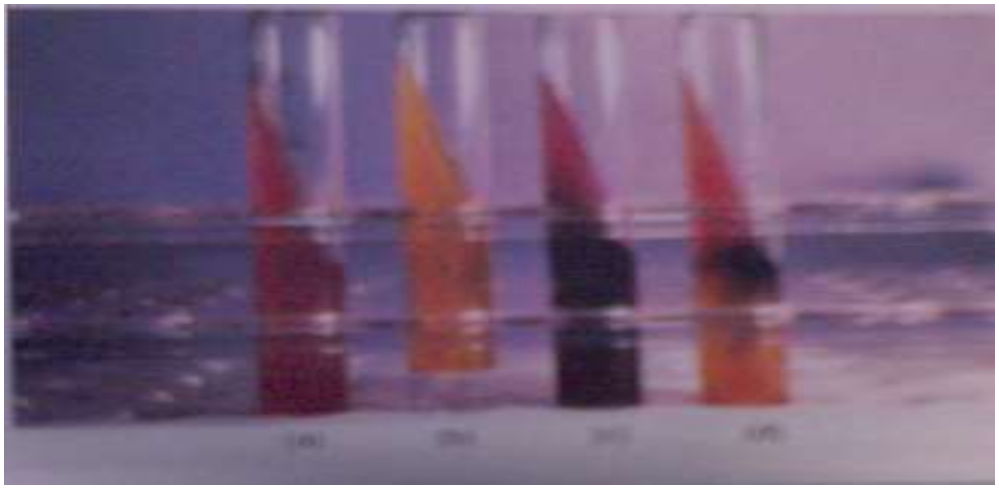
3- Red butt and slant : يشير إلى عدم تخمر أي من السكريات الثلاث ولا يكون هناك إنتاج للغاز أو H_2S .

4- Gas formation : يتم ملاحظته من وجود تشقق في الاكار .

5- Gas formation and H_2S production : ويلاحظ ذلك من تكون اللون الأسود في الاكار .

وهناك وسط أخر يدعى Kligler Iron agar وهو وسط تفريقي يشبه TSI ويستعمل لنفس الغرض .

وهناك وسط ثالث يدعى Sulfide Indol Motility media (SIM) يستخدم هذا الوسط لإجراء ثلاث اختبارات معاً تبعاً لطبيعة الوسط (لاختبار وجود الكبريت ، الاندول ، والحركه) . بعض الجراثيم تتحرك بالاسواط وهذه الحركة ممكن ملاحظتها بحقن الجرثومة في وسط شبه صلب semi solid وثبات اليد ضرورية جداً في هذا الاختبار إذ يجب أن يكون الطعن بنفس الخط ذهاباً وإياباً بإبرة دقيقة وبذا عندما تهاجر الجراثيم بحركتها تعطي خط ضبابي أو عكورة بعيدا عن خط الطعن . والجراثيم غير المتحركة يبقى نموها ضمن خط الطعن . تحرر غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S من المركبات العضوية أو غير العضوية الموجودة في الوسط . وعند تحرره يتفاعل مع كبريتات الحديد الامونياكيه ليكون كبرتيد الحديد الأسود هذا الراسب الأسود يمكن ملاحظته على طول خط الطعن إذا لم يكن الكائن متحرك أو على كل الوسط إذا كان متحركاً .

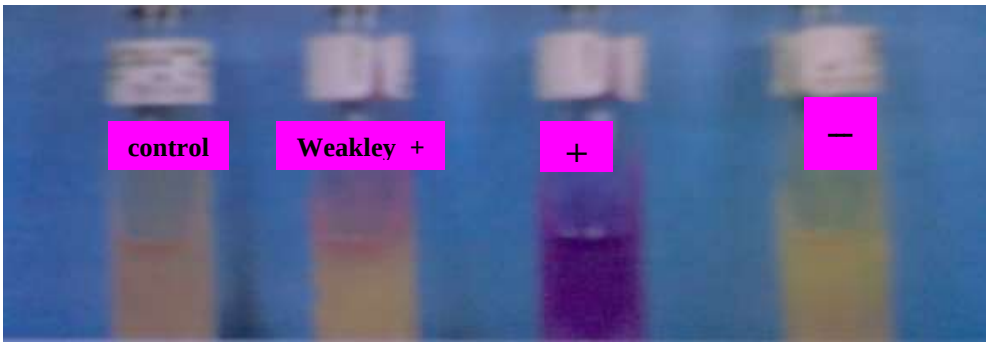


الجزء العملي :

1- تعليم الأنابيب برقم العينة الجرثومية ومكان الجمع وتاريخ الجمع .
2- حقن الأنابيب بالعينة الجرثومية
3- حضن الأنابيب بدرجة 37 ْم لمدة 24 ساعة .
4- قراءة النتائج بتغير اللون أو إنتاج كبريتيد الحديديك .

اختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease production test :

Urease هو إنزيم يحفز تحويل اليوريا إلى آمونيا وثاني اوكسيد الكربون ، ويكون هذا الاختبار مفيد جداً في تشخيص جنس المتقلبات *Proteus* ، بما أن أفراد العائلة المعوية الأخرى لا يستطيعون استغلال اليوريا أو يستغلونها ببطء شديد ، وكذلك يعد الاختبار مهم في تمييز *Proteus* عن غيرها من الجراثيم المعوية غير المخمرة لسكر اللاكتوز ، يستخدم لإجراء هذا الاختبار وسط يدعى Urea broth or agar يحتوي مرق اليوريا على مستخلص الخميرة yeast extract ، اليوريا urea ، وكاشف الفينول الأحمر Phenol red indicator الذي يكون احمر برتقالي في pH = 6.8 واحمر غامق إلى بنفسجي في pH = 8.1 تحضر مكونات الوسط وتعقم بجهاز المؤصدة عدا اليوريا تعقم بالترشيح ثم تضاف للوسط لماذا ؟ بعد حقن الوسط بالجرثومة المراد تشخيصها وحضنه بدرجة 37 ْم لمدة 24 ساعة تتجزأ اليوريا إلى امونيا و ثاني اوكسيد الكربون ، تتحد الامونيا مع الماء وتنتج هيدروكسيد الامونيوم ، القاعدة القوية التي ترفع الدالة الحامضية للوسط مما يؤدي إلى تغير لون الدليل إلى الوردي الغامق وهذا دليل ايجابي على الكشف .



الجزء العملي :

1- تعليم الأنابيب برقم العينة الجرثومية ومكان الجمع وتاريخ الجمع .

2- حقن الأنابيب بالعينة الجرثومية

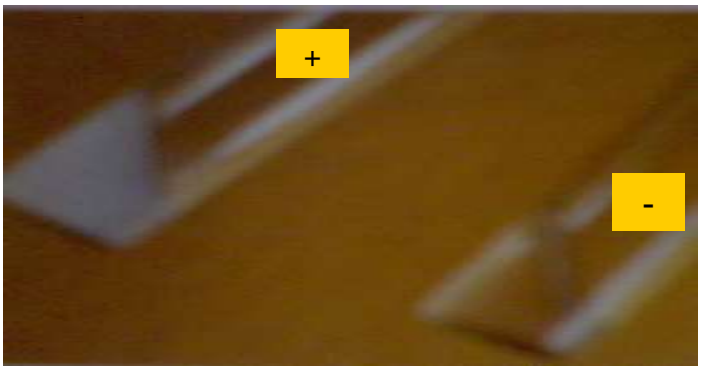
3 - حضن الأنابيب بدرجة 37 ْم لمدة 24 ساعة .

4 - قراءة النتائج بتغير اللون من الأصفر البرتقالي إلى الوردي الغامق .

اختبار إنزيم الكواكيوليز (التجلط) Coagulase test :

Coagulase هو الإنزيم الذي يجلط بلازما الدم بميكانيكية تشبه التجلط أو التخثر الطبيعي ، تستخدم هذا الاختبار للتمييز بين جنس المكورات العنقودية Staphylococci الممرضة وغير الممرضة ، هذا الإنزيم مؤشر جيد على المكورات العنقودية الممرضة وتدعى الجراثيم الموجبة لهذا الإنزيم (Coagulase Positive *Staphylococcus*) ويرمز لها (COPS) والسالبة له تدعى (Coagulase Negative *Staphylococcus*) ويرمز لها (CONS) . تستخدم البكتريا الممرضة هذا الإنزيم لتحيط نفسها بخثرة من الفايبرين لتقي نفسها من دفاعات العائل . تسبب الجراثيم الموجبة للإختبار تخثر أو تجلط البلازما (يضاف Citrate أو EDTA كمضاد للتخثر) ؟ لماذا . وتعتبر النتيجة سالبة إذا لم تتكون خثرة بعد 4 ساعات .

Coagulase + Coagulase Reacting Factor (CRF) ⟶ Coagulase + Thrombin (C – T) + Fibrinogen ⟶ Fibrin ((Clot))



الجزء العملي :

تحضير البلازما Plasma : تحضر البلازما عن طريق سحب 5 مل من دم (كل أنواع الدم عدا دم الفئران ، الدجاج ، خنازير غينيا) . ويوضع 0.5 غم من السترات أو EDTA لكل 5 مل من الدم ثم يطرد الأنبوب مركزيا لمدة 3-5 دقائق فيتم الحصول على البلازما .

1- تعليم الأنابيب برقم العينة الجرثومية ومكان الجمع وتاريخ الجمع .

2- حقن الأنابيب الحاوية على وسط نقيع القلب والدماغ Brain – Heart infusion بالعينة الجرثومية المراد تشخيصها وتحضن لمدة 24 ساعه بدرجة 37 ْم .

3 – بعد ذلك ينقل 0.1 مل من النمو الجرثومي إلى أنابيب معقمة حاوية على 0.3 مل من بلازما الدم مع ترك أنبوب سيطرة حاوي على البلازما فقط دون إضافة الجرثومة

4 - تترك الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة ويتم مراقبة تكون الخثرة كل 10 أو 15 دقيقة وذلك بتمييل الأنبوب جانبياً .

4 – بعد أربع ساعات تتم قراءة النتائج بتكوين الخثرة وكالتالي :

أ - +1 إذا كانت الخثرة في الربع الأول من الأنبوبة فقط

ب - +2 إذا كانت الخثرة تشغل نصف الأنبوبة .

ج - +3 إذا كونت الخثرة ثلاث أرباع الأنبوبة .

د - +4 إذا شغلت الخثرة الأنبوب بأكمله .

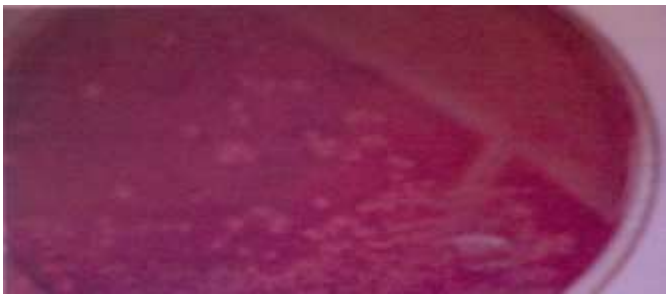
هـ - سالب إذا لم تظهر خثرة أبداً وبقيت البلازما سائلة كأنبوبة السيطرة .

ملاحظة : يجب التأكد من خلو الوسط ألزرعي و البلازما من السترات إذ أن بعض الجراثيم تستغل السترات وتحدث التجلط .

وعند استخدام أكياس بلازما الدم يجب التأكد من تاريخ الصلاحية لكي لا تعطي نتائج كاذبة

اختبار تحلل الدم Blood hemolysis test :

بعض أفراد الجنس ***Streptococcus*** تفرز إنزيمات خارجية **exoenzymes** التي تؤدي إلى تحلل كريات الدم الحمر ، تدعى هذه الإنزيمات بالإنزيمات المحللة للدم **Hemolysins** . النوع المرضي من المكورات المسبحية ينتج نوع يدعى **β – hemolysins** ، الذي يؤدي إلى تحليل كريات الدم الحمر بصورة تامة ويتم الاستدلال عليه من تكون حلقة شفافة حول المستعمرة الجرثومية على أطباق أكار الدم **Blood agar** ، يستخدم دم الأغنام بنسبة 5 % من حجم الوسط لماذا يضاف دم الخراف ؟



الجزء العملي :

1- تحضر أطباق أكار الدم بإضافة دم الخراف إلى وسط أكار الدم **Blood agar base** بعد تحضيره وتعقيمه بجهاز المؤصدة يبرد لدرجة 50 ْم ثم يضاف له الدم بظروف معقمة .

2- تزرع العينة المراد تشخيصها على أكار الدم وتحضن بدرجة 37 ْم ولمدة 24 – 48 ساعة وبظروف قليلة التهوية .

3- تقرأ النتائج بتكون حلقة شفافة حول المستعمرة تدل على التحلل الكامل **β -hemolysis** للدم أو حلقة خضراء اللون تدل على التحلل الجزئي **α-hemolysis** أو عدم وجود تغيير في الوسط وذلك يشير لعدم تحلل الدم **γ- hemolysis** .

اختبار إنزيم الأوكسيديز Oxidase test :

ويسمى هذا الاختبار أيضاً **Cytochrome C** و إنزيم **Oxidase** هو إنزيم يلعب دور مهم في عملية النقل الالكتروني خلال التنفس الهوائي . يستخدم هذا الاختبار لتمييز الأجناس , ***Neisseria*** , ***Pseudomonas***

Vibrio , Aeromonas , Compylobacter , Alcaligenes عن غيرها من الجراثيم وتكون جميع افراد العائلة المعوية سالبة لهذا الاختبار يعتمد الاختبار على اختزال كاشف أو عامل (dimethyl-para-phenylenediamine hydrochloride) العديم اللون إلى البنفسجي . يجرى هذا الاختبار بطريقتين .

1 – طريقة الأطباق Plat method : إذ يغطى سطح الطبق الحاوي على المستعمرة المراد تشخيصها بالكاشف بعيداً عن الضوء فالمستعمرات التي تتحول أنياً إلى اللون البنفسجي تكون موجبة للاختبار .

2 – طريقة أوراق الترشيح filter paper method : وهي الطريقة الشائعة الاستخدام إذ يتم غمر ورقة الترشح بالكاشف في جو مظلم ثم تنقل المستعمرة المراد اختبارها بعود خشبي إلى الورقة الحاوية على الكاشف وتخلط مع الكاشف ثم تقرأ النتيجة أنياً (5 – 10 ثواني) .

وهناك طريقة وجدت للاستخدام بعيد الأمد أو لحفظ الكاشف لفترات طويلة إذ تغمر ورقة ترشيح بالكاشف وبعدها يعمل لها تجفيد وتحفظ في وعاء محكم الغلق معقم وتحفظ لعدة شهور بدرجة حرارة الغرفة وعندما يراد استخدامها توضع بطبق بتري وترش بالماء المعقم وتوضع فوقها المستعمرة وتقرا النتائج .

ملاحظة : يجب استخدام أعواد من البلاستك أو الزجاج أو الخشب لنقل المستعمرات ولا يستخدم اللوب المصنوع من الحديد

يجب أن يجرى الاختبار على وسط الاكار المغذي ولا يجرى أبداً على الماكونكي لان لونه بنفسجي وقد يعطي نتيجة كاذبة .

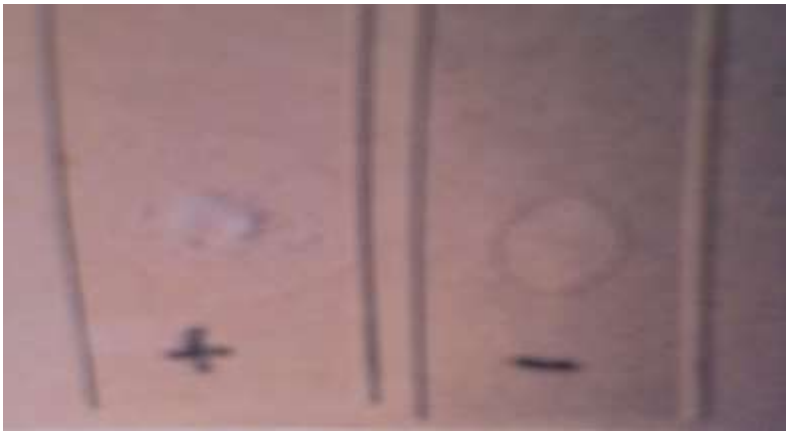
الجزء العملي :

1- يحضر كاشف الاوكسيديز بوزن 0.05 غم من الكاشف وتذاب في 10 مل ماء مقطر معقم ويحفظ في أنبوبة معتمة .
2- توضع ورقة ترشيح من نوع Whitman's No. 1 في طبق بتري معقم ومغلف بغلاف يمنع الضوء .
3- توضع قطرة من الكاشف على ورقة الترشيح وتنقل المستعمرة المراد تشخيصها بواسطة عود خشبي إلى الكاشف وتخلط برفق على ورقة الترشيح مع الكاشف .
4- تقرأ النتيجة أنياً بظهور اللون البنفسجي .

اختبار إنزيم الكاتليز Catalase test :

يستخدم هذا الاختبار للتمييز بين جنسي *Staphylococcus* الموجبة للاختبار و *Streptococcus* السالبة للاختبار وجود الأوكسجين ممكن أن يظهر مختلف التأثيرات على الجراثيم اللاهوائية الإجبارية فهو ممكن أن

يقتلها بسبب النواتج السامة (جذور السوبراوكسيد O_2^- Superoxide radical ، Hydroxyl radical OH ، H_2O_2 Hydrogen peroxide) بعض نواقل الالكترونات Flavoprotein يمكن أن تختزل الأوكسجين مباشرة وتكون جذور السوبراوكسيد . وجود إنزيمين هما Superoxide dismutase و Catalase يمنح الجراثيم اللاهوائية مقاومة التأثيرات الضارة من التعرض للأوكسجين لان Superoxide dismutase يحول جذور السوبراوكسيد إلى بيروكسيد الهيدروجين وجذر الأوكسجين (O_2.) ، Catalase يحطم بيروكسيد الهيدروجين لينتج ماء وأوكسجين الذي يظهر كفقاعات يمكن رؤيتها . الجراثيم اللاهوائية تفتقر لهذين الإنزيمين لذا لا تتحمل وجود الأوكسجين . يجرى هذا الاختبار بطريقتين أما بأنبوب الاختبار الحاوي على المستعمرات النامية أو تنقل المستعمرات على شريحة زجاجية ويضاف لها كاشف بيروكسيد الهيدروجين أو قد تضاف قطرات من الكاشف على سطح المستعمرة النامية على وسط الاكار المغذي .



الجزء العملي :

1 – يحضر كاشف البيروكسيد بتخفيف مادة H_2O_2 مع الماء المقطر المعقم إلى تركيز 3 % .

2 – يضاف الكاشف على سطح المستعمرة النامية على الطبق أو يتم نقل المستعمرة إلى الشريحة الزجاجية الحاوية على قطره من الكاشف أو يتم إضافة قطرة من الكاشف إلى المزرعة النامية على أنبوبة المرق المغذي .

3 – تقرأ النتائج بتكون فقاعات هوائية دليل على تحرر غاز الأوكسجين .

ملاحظة : يجب أن لا يجرى الاختبار على المزارع النامية على وسط أكار الدم ، لماذا ؟

ويجب عدم استخدام لوب حديدي لنقل المستعمرات لان الحديد يؤكسد البيروكسيد إلى ماء وغاز الأوكسجين وبالتالي يعطي نتائج كاذبة