الطرق والمعايير المعتمدة في تصنيف وتشخيص الأحياء المجهرية:

1- الخصائص المظهرية *Morphology*

ان الخصائص التركيبية المظهرية ساعدت علماء التصنيف على تصنيف الكائنات الحية لأكثر من ٢٠٠ سنة. الكائنات الراقية غالباً ما تصنف وفقاً لملاحظة التفاصيل المظهرية لها. لكن بعض الأحياء المجهرية تبدو متشابهة تماماً ولا يمكن ان يعتمد على الخصائص المظهرية في تصنيفها. ان الأحياء كبيرة الحجم ليست دائماً سهلة التصنيف ,فمثلاً *"Pneumocystis jiroveci pneumonia"* من الكائنات التي غالباً ما تكون ممرضة انتهازية للأشخاص المصابين بالإيدز AIDS acquired immune deficiency syndrome. الـ pneumocystis والتي تتسبب بمرض التهاب الرئة pneumonia في الانسان, تكون فاقدة للتراكيب التي تسهل تشخيصها والتعرف عليها , ومنذ ان اكتشفت عام ١٩٥٩ لم يكونوا علماء الأحياء متأكدين من تصنيفها , وبالرغم من انها كانت مصنفة على انها من الأوالي Protozoa لكن الدراسات الحديثة التي استندت على مقارنة التسلسل النيكلوتيدي للـ rRNA مع التسلسل النيكلوتيدي للـ rRNA للأوالي والنباتات والاعفان والثدييات والفطريات كانت نتيجة تلك المقارنة انها صنفت ضمن مملكة الفطريات. ان الشكل المظهري للخلية لا يقدم إلا الشيء القليل عن العلاقة التطورية لهذا الكائن, لكن رغم ذلك فأن علم المظهر والشكل Morphology للخلية ما زال مفيد في تشخيص وتعريف البكتريا, مثال ذلك الأختلافات في موقع السبورات الداخلية والأسواط وغيرها.

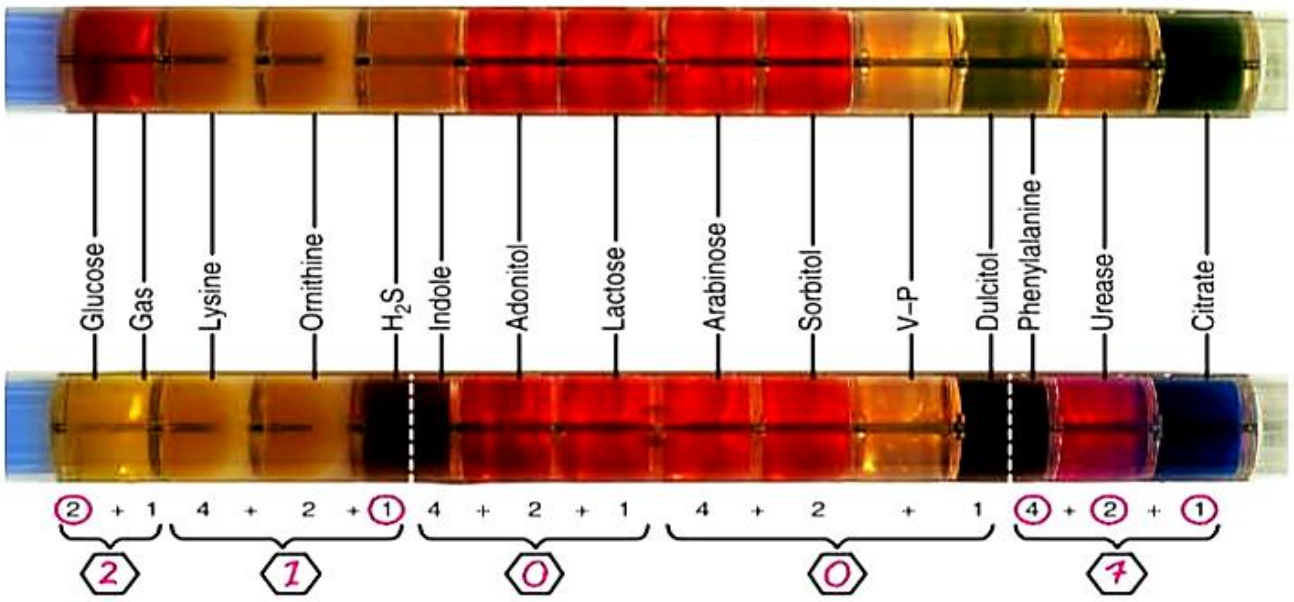
2- التصبيغ التفريقي *Differential Staining*

ان اول خطوة في تشخيص البكتريا هي تصبيغها بصبغة كرام , حيث ان معظم البكتريا اما تكون موجبة او سالبة لصبغة كرام, بالإضافة الى ان هناك صبغات اخرى كصبغة acid fast stain والتي تكون مفيدة في تشخيص مجموعة محدودة من البكتريا. وكما هو معلوم فان التصبيغ يعتمد على المكونات الكيميائية للجدار الخلوي, لذلك فأن هذه الأصباغ تكون عديمة الفائدة في حال كون البكتريا فاقدة للجدار الخلوي كما في بكتريا Mycoplasma وكذلك في حالت الأركيا Archaea التي تملك جدار خلوي غير اعتيادي. الفحص المجهري باستخدام صبغة كرام وصبغة acid fast يعتبر مفيد للحصول على معلومات سريعة عن المسبب المرضي.

3- الفحوصات الكيموحيوية *Biochemical tests*

ان الفعاليات الأنزيمية غالباً ما تستعمل في التفريق بين البكتريا, حتى المتقاربة جداً منها يمكن ان يفصل بينها الى انواع محددة عند أخضاعها للفحوصات الكيموحيوية, مثل تحديد قدرتها على تخمير تشكيلة من السكريات. بالإضافة الى ذلك فان هذه الفحوصات تعطي فكرة واضحة للبيئة التي تعيش فيها الأنواع ضمن النظام البيئي. على سبيل المثال : البكتريا التي تستطيع تثبيت غاز النيتروجين او التي تؤكسد عناصر الكبريت سوف تكون مصدر للمغذيات المهمة للنباتات والحيوانات. البكتريا المعوية السالبة لصبغة كرام والتي تشكل مجموعة كبيرة ومتباينة من الميكروبات والتي تستوطن بشكل طبيعي القناة المعوية للإنسان والحيوان, هذه العائلة تتكون من عدة ممرضات والتي غالباً ما تسبب الأسهال. هناك عدد من الفحوصات التي طورت لتسريع وتسهيل التعرف على هذه البكتريا وتشخيصها. حيث ان الأطباء غالباً ما يحتاجون الى معلومات سريعة ودقيقة عن المسبب المرضي ونوعه ليسهل علية معالجة المريض. جميع اعضاء العائلة المعوية تكون سالبة لفحص الـ oxidase لكنها تختلف فيما بينها في قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز وانتاجها لأنزيمات اخرى. هذه الاختلافات سهلة عملية التفريق بين انواع هذه العائلة . استخدمت الأوساط التفريقية differential media والانتقائية selective media بالإضافة الى الفحوصات الاخرى لتشخيص انواع البكتريا استناداً الى قابليتها على النمو في وسط وعدم قدرتها على النمو في وسط اخر. رغم ذلك فأن هذه الفحوصات تتطلب وقت. لذلك طور العلم الحديث تقنيات حديثة ساعدت على اختصار الوقت المطلوب في تشخيص البكتريا منها طرق الـ Rapid Identification methods حيث صممت هذه الطريقة بحيث يتم اجراء عدة فحوصات كيموحيوية في وقت واحد واعطاء النتيجة خلال ٤-٢٤ ساعة فقط. إحدى هذه الطرق تدعى بطريقة التشخيص العددي **numerical identification** , حيث ان نتائج الاختبارات تكون بشكل رقـــم محـــدد لكل فحص. وكل مجموعة ارقام تمثل نوع بكتيري معين (الشكل -١).

حالياً ظهرت اجهزة تشخيص حديثة اكثر تطوراً واعلى دقة واسهل استخداماً من التي سبقتها حيث تكون مرتبطة بحاسوب آلي يظهر النتائج. مثال تلك الأجهزة هي vitek system and microscan system .



ID Value	Organism	Atypical Test Results	Confirmatory Test
21006	*Proteus mirabilis*	Ornithine⁻	Sucrose
21007	*Proteus mirabilis*	Ornithine⁻	
21020	*Salmonella choleraesuis*	Lysine⁻	

Figure 1. The analytical profile index (API) system.

٤- علم الأمصال *Serology*

علم الأمصال: هو العلم الذي يتناول دراسة مصل الدم serum والاستجابات المناعية الواضحة في المصل. الأحياء المجهرية هي كائنات مستضدية Antigenic organism بمعنى إنها كائنات اذا دخلت في جسم الأنسان او الحيوان تؤدي الى حدوث استجابة مناعية immunity response هذه الاستجابة تكون على شكل اجسام مضادة Antibody. الأجسام المضادة هي عبارة عن بروتين دائر في الدم ويمكنها ان ترتبط بشكل (عالي التخصص) مع البكتريا التي أدت الى انتاج هذه الأجسام المضادة.

على سبيل المثال: عند حقن الأرنب ببكتريا (التيفؤيد المقتولة), فأن ذلك يؤدي الى استجابة الجهاز المناعي للأرنب وانتاج اجسام مضادة متخصصة ضد هذه البكتريا. المحاليل التي تحتوي على الأجسام المضادة يمكن ان تستخدم في تشخيص وبالتالي تصنيف عدد من الأحياء المجهرية المهمة طبياً , هذه المحاليل تسمى Antiserum (antisera). في حال عزل بكتريا غير معروفة من شخص

مريض فمن الممكن استخدام هذا المحلول لتشخيص هذه البكتريا بسرعة. يستخدم اختبار التلازن slide agglutination test للكشف عن نوع معين من البكتريا.

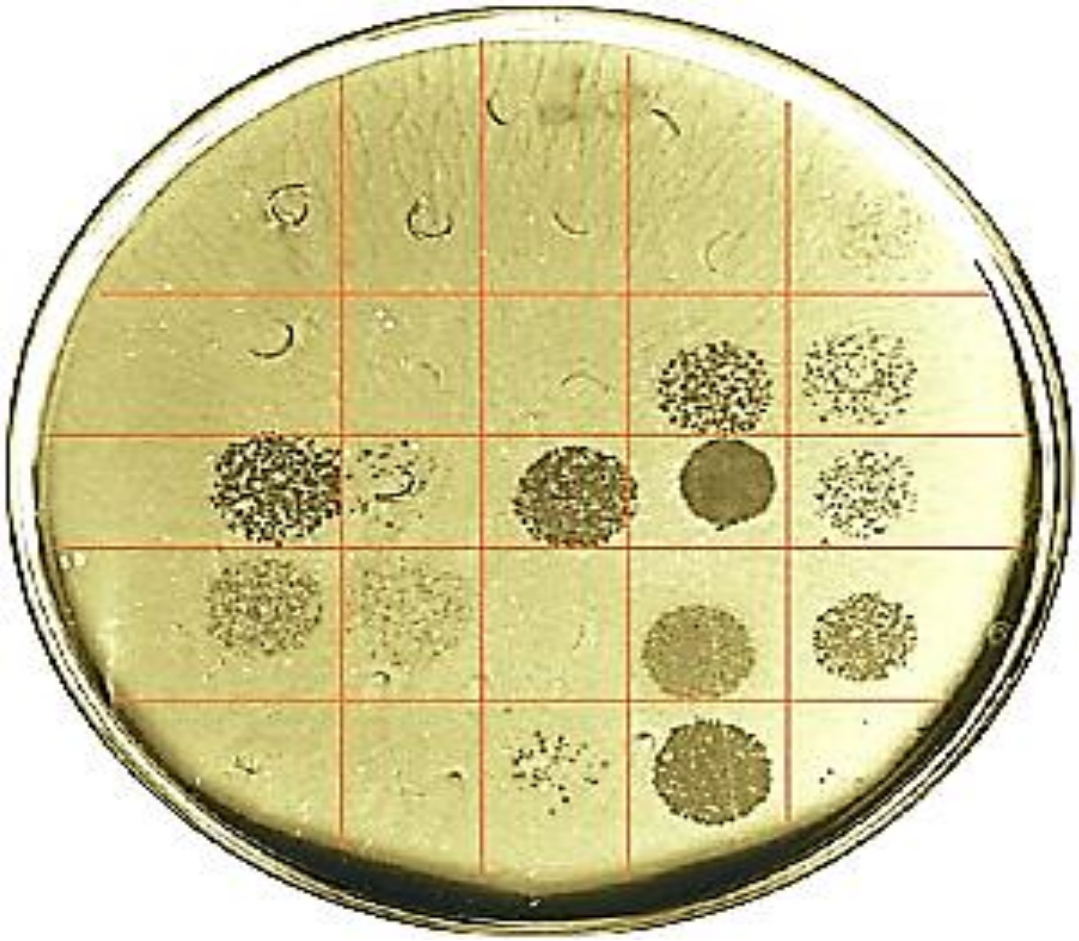
ان الفحوصات المصلية يمكن ان تستخدم للتفريق ليس فقط الأنواع بل حتى السلالات strains حيث ان السلالات التي تمتلك انتيجينات مختلفة تدعى serotypes و serovars or biovar. عالمة الأحياء Rebecca Lancefield صنفت سلالات بكتريا الـ streptococcus خلال دراستها للتفاعلات المصلية لهذه البكتريا. حيث تبين لها من خلال هذ الدراسة ان الجدار الخلوي cell wall لمختلف انواع هذه البكتريا يحتوي على انتجينات مختلفة ويمكن ان تحفز الجهاز المناعي على تكوين مختلف الاجسام المضادة. وبالمقارنة فأن بعض البكتريا تتشابه في تركيب Antigen معين لذلك سوف تؤدي الى تحفيز تكوين جسم مضاد Antibody من نوع واحد, وهذه الحالة تعكس كذلك صلة التقارب التصنيفي بينها.

هناك اختبار اخر للكشف عن الأجسام المضادة هو enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) وهو شائع الاستخدام بسبب انه سريع ويمكن قراءة النتائج باستخدام الحاسوب. في هذا الجهاز يمكن الكشف عن الأجسام المضادة المنتجة ضد Antigen معين فتسمى (indirect *ELISA*), ويمكن ان يستخدم للكشف عن الأنتجين نفسه فيطلق علية اسم (direct *ELISA*).

٥- التنميط بواسطة العاتي *Phage Typing*

هذا الفحص يستخدم لتحديد نوع العاتي (Bacteriophage) الذي يصيب البكتريا, وكما هو معلوم فأن العاتيات هي فايروسات قادرة على اصابة بكتريا معينة وتحليلها. العاتيات تكون عالية التخصص اوقد تتخصص بمجموعة من السلالات البكتيرية ضمن النوع الواحد. ومما تجدر الاشارة الية ان هناك سلالة لبكتريا ما تكون حساسة لنوعين مختلفين من العاتيات, وهناك سلالة اخرى لنفس النوع البكتيري تكون حساسة لثلاث انواع مختلفة من العاتيات.

احد الطرق المستخدمة في التنميط باستخدام العاتي, تتضمن نشر البكتريا المراد تنميطها على طبق يحتوي اكار, وبعد ان تنمو هذه البكتريا توضع قطرة من مختلف العاتيات على هذه البكتريا في الطبق. العاتي الذي يكون قادر على اصابة هذه البكتريا سيظهر ذلك على شكل بقع تمثل الخلايا البكتيرية المتحللة نتيجة اصابتها بالعاتي. هذه البقع المتحللة تسمى (plaques).



Phage typing of *Salmonella enterica*

٦- الخصائص البيئية *Ecological Characteristics*

تعتبر مقدرة البكتريا على المعيشة في بيئة معينة من الأمور المهمة تصنيفياً. حيث ان بعض الميكروبات يبدو متشابه مع عدد كبير من الميكروبات لكنه يختلف عنها في خاصيته على المعيشة في بيئات متطرفة. لذلك فأن انماط دورة الحياة للكائن الحي وطبيعة العلاقة التعايشية وقابليته على احداث المرض في المضيف والمتطلبات البيئية مثل الأوكسجين ودرجة الحرارة والضغط الأزموزي, من الخصائص المهمة التي تساعد على تشخيص وتصنيف البكتريا.

٧- التحليل الوراثي *Genetic Analysis*

يعتبر التكاثر الجنسي sexual reproduction في معظم الكائنات حقيقية النواة ذو اهمية كبيرة في تصنيفها. وعلى الرغم من ان بدائية النواة لا تتكاثر جنسياً, لكن دراسة تبادل الجين الكروموسومي خلال عملية Transformation, Conjugation and Transduction تعتبر مفيدة في تصنيف هذه الكائنات.

- Transformation (التحويل)- هذه العملية ممكن ان تحدث بين مختلف **انواع** species بدائية النواة, لكن **قلمـــــا تحدث بين الأجناس** genera. ان عملية التحول التي تحدث بين سلالتين تعطي دليل واضح على كونهما متقاربين جداً تصنيفياً حيث ان عملية التحول لا تحدث إلا عندما يكون الجينوم البكتيري لكلا الخليتين البكتيريتين متشابهان الى حد كبير. تمت دراسة عملية التحول في العديد من الأجناس ضمت : *Bacillus, Micrococcus, Haemophilus, Rhizobium,* بالإضافة الى اجناس اخرى.
- Conjugation (الاقتران) – ان دراسة عملية الاقتران بين البكتريا تقدم معلومات مفيدة في تصنيفها خصوصاً تلك التي تحدث بين البكتريا المعوية. مثال ذلك: بكتريا *Escherichia coli* يمكنها ان تقترن مع أجناس بكتريا *Salmonella and Shigella* لكنها لا تستطيع الاقتران مع *Proteus and Enterobacter* على الرغم من ان جميع هذه الأجناس تقع ضمن عائلة واحدة. هذه الملاحظات برهنت على ان هناك تقارب تصنيفي بين الأجناس الثلاثة المذكورة انفاً.
- Plasmids – تعتبر البلازميدات ذات اهمية تصنيفية والسبب في ذلك يعود لكونها تربك وتشوش تحليلات الخصائص المظهرية للبكتريا. معظم اجناس البكتريا يمتلك بلازميدات, وبعض هذه البلازميدات يمكن ان تمر او تعبر بسهولة (نسبياً) الى بكتريا اخرى. مثل هذه البلازميدات تشفر لصفة او (صفات) مظهرية تؤدي الى تطور في المخطط التصنيفي, والباحث في هذا المجال يبدو له للوهلة الأولى ان هذه الصفة هي مشفرة كروموسومياً. لذلك فأن الخصائص المظهرية طالما تسيء الفهم. على سبيل المثال: خاصية انتاج كبريتيد الهيدروجين و تخمير سكر اللاكتوز في البكتريا تعتبران جداً مهمة في تصنيف البكتريا المعوية, رغم ذلك فأن الجينات المشفرة لهاتين الصفتين ممكن ان تتواجد على البلازميدات وبالتالي يمكنها ان تنتقل من بكتريا الى اخرى.