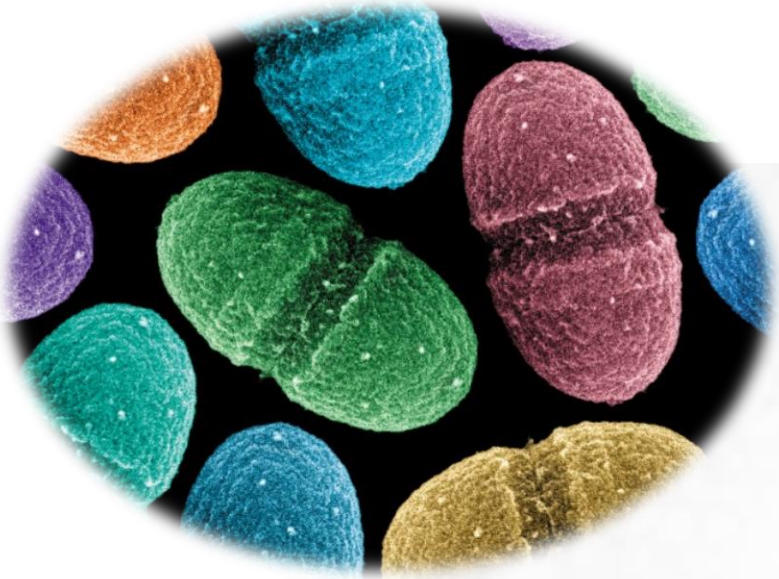
# جزوه آزمایشگاه میکروب شناسی



دکتر زهرا طیبی

**بسمه تعالی**

## توجه: دانشجویان محترم رعایت نکات زیر در آزمایشگاه میکروبیولوژی الزامی است:

### الف: نکات ایمنی

۱. بدون روپوش به ازمایشگاه وارد نشوید. در آزمایشگاه دگمه های روپوش را بسته و آن را جداگانه هفته ای یک بار شسته و اتو نمایید.

۲. در آزمایشگاه از خوردن، آشامیدن، و دست زدن به سر و صورت اکیداً خودداری فرمایید.

۳. وسایل شخصی (کیف، کتاب، عینک، ساعت و...) را روی میز آزمایشگاه قرار ندهید. حتی الامکان از آوردن وسایل اضافی خودداری نمایید.

۴. در صورت ابتلا به بیماری خاص و یا وجود زخم و بریدگی در دستهایتان، قبل از شروع کار به مسئول آزمایشگاه مراجعه نمایید.

۵. چنانچه در حین انجام کار یکی از محیط های کشت شکست و یا از محیط مایع آلوده قطراتی روی میز ریخت، به منظور جلوگیری از انتشار آلودگی، مسئول آزمایشگاه را مطلع کرده تا محل را ضدعفونی نمایند.

۶. لام و سوابهای استفاده شده را در ظروف محتوی محلول ضدعفونی که روی میزها قرار داده شده است بگذارید.

۷. بعد از اتمام کار، چراغ گاز را خاموش و شیر اصلی آن را ببندید. پس از رنگ آمیزی، شیشه های حاوی رنگ را در محل اصلی خود قرار دهید. بعد از انجام کار، عدسی میکروسکوپ را با کاغذ مخصوص پاک کرده و میز کار خود را تمیز نمائید.

۸. پس از مشاهده نتایج پلیت ها و لوله های آلوده را در جایگاه مخصوص حمل محیط های آلوده (ترالی) گذاشته تا پس از ضدعفونی دفع گردند.

۹. قبل از ترک آزمایشگاه حتماً دست های خود را با آب و صابون و ماده ضدعفونی بشویید.

## ب: نکات انضباطی

۱. انجام کارهای عملی میکروب شناسی در آزمایشگاه می بایستی در نهایت نظم، سکوت، دقت و در کنار شعله صورت گیرد، لذا، از دانشجویان درخواست می شود در طول برگزاری کلاس، این نکات را رعایت و محل خود را تغییر ندهید.

۲. در صورت غیبت بیش از دو جلسه در کلاس عملی به هر دلیلی، دانشجو از حضور در کلاس های بعدی معذور و حق شرکت در امتحان را نخواهد داشت.

۳. حضور به موقع دانشجو در کلاس عملی الزامی است و هرگونه غیبت موجه یا تاخیر در کلاس های عملی، منجربه کسر نمره این درس خواهد شد.

۴. توصیه می گردد نسبت به حفظ وسایل آزمایشگاه و لام های اختصاصی کوشش نمایید.

## آشنایی با وسایل و دستگاه های آزمایشگاه میکروب شناسی:

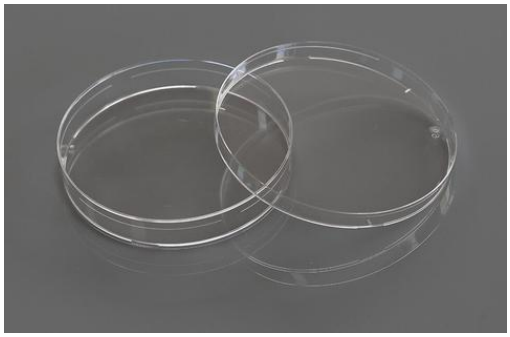
بعضی از وسایل و دستگاه های مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی و همچنین موارد استفاده آنها در زیر شرح داده شده:

## لوله ها و انواع وسایل شیشه ای در آزمایشگاه میکروبیولوژی:

وسایل شیشه ای مورداستفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی باید مقاوم به حرارت باشند تا دمای سترون سازی را به خوبی تحمل نمایند. از این لوله ها برای تهیه محیط های کشت مایع، جامد و شیب دار برای رشد میکروب ها و همچنین مشاهده پدیده های بیوشیمیایی استفاده می کنند. لوله ها را به طور معمول در جالوله ای یا سبد سیمی نگهداری می کنند.

**لوله دورهام:**لوله ای کوچک با قطر داخلی ۷/.میلی متر و طول حدود ۳ سانتی متر است که برای پی بردن به توانایی میکروارگانیسم ها در تولید گاز به کار می رود. ویژگی لوله های دورهام این است که اگر آن را از آب پر کرده و وارونه کنیم خاصیت چسبندگی آب و شیشه مانع از بیرون ریختن آب خواهد شد و تنها زمانی که میکروارگانیسم ها تولید گاز نمایند در انتهای آن حباب ایجاد می شود. لوله های دورهام به صورت وارونه درون لوله های معمولی قرار می گیرند.

**پلیت (پتری دیش):** ظروف شیشه ای یا پلاستیکی یکبار مصرف گرد و بشقابی شکل که در اندازه های مختلفی وجود دارند ارتفاع آنها در حدود ۱/۵ سانتی متر می باشد. سرپوش پلیت نیز مانند قسمت زیرین است با این تفاوت که کمی بزرگتر بوده. این ظروف برای حفظ محیط کشت جامد استفاده می شوند. و در انواع یک تا چند خانه ای وجود دارند.



**فیلدوپلاتین (میله پلاتین، لوپ، آنس):** از مهمترین وسایل آزمایشگاه میکروب شناسی که برای برداشت و انتقال میکروارگانیسم ها به کار می رود. این وسیله میله ای فلزی بوده که دسته آن با پوشش لاستیکی دارای عایق حرارتی می باشد و در انتها نیز سیمی حلقوی از جنس پلاتین یا نیکروم وجود دارد.

به سه شکل می باشند:

۱. سرسوزنی (Needle)
۲. حلقه ای (Loop)
۳. سرکج

**پی پت:**

لوله های شیشه ای مندرج ، در حجم های متفاوت می باشند که انواع معمولی، حباب دار و سرنگ دار آن موجود می باشد.

**لام:** یک قطعه شیشه ای است که معمولا برای مشاهده میکروب ها به حالت زنده یا رنگ آمیزی شده و یا شمارش آنها استفاده می شود. اندازه آن در حدود ۱×۲۵×۷۵ میلی متر است. سه نوع لام وجود دارد:

۱. لام ساده: یک قطعه شیشه ساده که برای مشاهده میکروب ها به حالت زنده یا رنگ آمیزی شده مورد استفاده قرار می گیرد.
۲. لام توگرد: وسط این لام فرو رفته بود و غالباً از آن برای مشاهده میکروب ها به حالت زنده یا قطره معلق(Hanging Drap) شده استفاده می شود.
۳. لام شمارش: وسط این لام مدرج بوده و معمولاً از آن در جهت مشاهده میکروب ها، گلبول سفید و قرمز خون استفاده می شود.

**لامل:** قطعه نازکی از جنس شیشه است و دارای اندازه های متفاوتی می باشد. به هنگام مشاهده میکروب های زنده بر روی نمونه میکروبی، روی لام قرار داده می شود.

## تشتک رنگ آمیزی:

یک وسیله فلزی مستطیل شکل است که معمولا از جنس استیل می باشد. و بر روی آن میله هایی قرار دارند که لام را در موقع رنگ آمیزی روی آنها قرار می دهند و رنگ اضافه به درون تشتک ریخته می شود.

**پی ست :**یه وسیله پلاستیکی بطری شکل است. در سر بطری یک لوله پلاستیکی وجود دارد که برای ریختن آب و شستشوی رنگ با آب مورد استفاده قرار می گیرد.

**قطره چکان:** این وسیله با یک لوله شیشه ای و درب پلاستیکی حباب دار، برای چکاندن رنگ بر روی لام استفاده می شود. البته نوع پلاستیکی آن نیز وجود دارد.

## ارلن:

برای ساختن و نگهداری محیط های کشت از این وسیله استفاده می کنند. ارلن ها از نظر اندازه متفاوت می باشند و بر حسب نوع آزمایش از انواع متفاوت آنها استفاده می شود.

**سمپلر:** برای نمونه برداری نمونه های آزمایشگاهی در مقیاس میکرولیتری به کار می رود.

## انکوباتور یا گرمخانه (Incubator):

اتاقکی است که حرارت درون خود را در دمای مشخص ثابت نگه می دارد و برای رشد میکروارگانیسم ها در دمای مناسب مورد استفاده قرار می گیرد. در واقع انکوباتور دستگاهی است که شرایط حرارتی مناسب رشد را برای میکروب ها بوجود می آورد. این وسیله در شکل ها و اندازه های متفاوتی وجود دارد که حتی برخی از انها قادرند میزان $CO_2$ درون دستگاه را در میزان معینی نگه دارند که به آنها انکوباتورهای $CO_2$ دارگفته می شود و برخی نیز برای به هم زدن مداوم محیط های کشت مایع دار در حجم های بالا که میکروب های خاصی در آن تلقیح شده است اختصاص یافته اند که به آن انکوباتور چرخاننده یا شیکر انکوباتور می گویند. انکوباتور یخچال دار مجهز به دستگاه سرد کننده بوده و برای رشد باکتری های سرما دوست (Psychrophilic)استفاده می شوند.

## اتوکلاوAutoclave (حرارت مرطوب):

در قرن نوزدهم برای اولین بار اتوکلاوهای بخار برای استریل و سترون کردن مایعات به کار گرفته شد ولی با پیشرفت علم و تکنولوژی در حال حاضر از این دستگاه برای موارد متفاوتی از قبیل مایعات، تجهیزات و سایر موارد استفاده می شود. اتوکلاو دستگاهی است که برای استریلیزه یا سترون نمودن لوازم، تجهیزات یا محیط های کشت استفاده می گردد. برتری اتوکلاو نسبت به سایر دستگاه های حرارتی استفاده از بخارآب است که امکان سترون سازی لوازم دارای قسمت های پلاستیکی را نیز به ما می دهد. اتوکلاو دستگاهی است که در اثر حرارت و فشار بخارآب باعث سترون سازی البسه، محیط های کشت، نمونه های آلوده و... می شود. اتوکلاو را می توان همچون دیگ زودپز بزرگی در نظر گرفت که فشار را تا ۱۵ پوند بر اینچ مربع بالا می برد و در نتیجه آن فشار ،آب در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد می جوشد. شایان ذکر است که تمامی میکروارگانیسم ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار بخار مزبور از بین می روند. (حتی اسپورهای مقاوم به حرارت)

دما و فشار در اتوکلاو طبق استانداردهای بین المللی توسط کارخانه سازنده تنظیم می شود. براساس استاندارد در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار (۱۵ پوند) ابزارآلات باید حداقل به مدت ۱۵ دقیقه تحت فرایند سترون سازی قرار گیرند و در دمای ۱۳۴ درجه سانتیگراد و فشار (۳۰ پوند) مدت زمان سترون سازی حداقل ۳ دقیقه است. بدین معنی که با افزایش فشار درجه حرارت نیز افزایش می یابد و زمان کاهش می یابد.

## فور Oven (حرارت خشک):

از این دستگاه به منظور سترون نمودن وسایل شیشه ای، فلزی (پنس، سوزن، قیچی، اسکارپل)، پودرها، روغن ها استفاده می شود.

در این دستگاه در دمای ۱۷۱ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت، در دمای ۱۸۰ درجه سانتیگراد در مدت ۰/۵ ساعت و در دمای ۱۹۱ درجه سانتیگراد در مدت ۶ تا ۱۰ دقیقه وسایل استریل می شوند.

در این دستگاه پنکه کوچکی قرار دارد که هوا را در داخل دستگاه به جریان می آورد و سبب می شود هوای داغ به یک اندازه به تمام قسمت های جسم اثر بگذارد. باید دقت داشت قبل از استریل نمودن وسایل از تمیز و خشک بودن آنها به منظور ممانعت از شکسته شدن مطمئن بود. و در اتمام کار با این دستگاه تا زمانیکه درجه حرارت به زیر ۵۰ درجه سانتیگراد نرسیده است نباید درب دستگاه را باز نمود.

## هود:

این دستگاه به علت داشتن نوعی صافی مخصوص و عبور چرخشی هوا باعث به وجود آمدن فضایی عاری از میکروب می شود.هود ها انواع مختلفی دارند و براساس حساسیت کار از انواع مختلف آنها استفاده می شود.

## شیکر (Shaker):

این دستگاه برای تکان دادن نمونه های مورد آزمایش مانند محیط های کشت مایع و یا نمونه های سرولوژی را انجام داد. عمل تکان دادن در یک سطح افقی، علاوه بر توزیع یکسان دما در محیط کشت مانع از رسوب کردن میکروب ها شده و فرصت را برای میکروب ها فراهم می کند تا از تمام مواد غذایی موجود در محیط کشت استفاده کنند. علاوه بر این عمل هوادهی و رساندن اکسیژن به سلول ها در محیط بهتر صورت می گیرد. دستگاه های شیکر معمولا به دو شکل می باشد شامل:

۱. نوع اوربیتالی: که حرکت دورانی دارند.
۲. نوع ضربه ای: حرکت ضربه ای (به طرف جلو و عقب) دارند.

میزان هوادهی در نوع اوربیتالی به مراتب بیشتر از نوع ضربه ای است.

### سانتریفوژ:

این دستگاه انواع گوناگونی دارد. ساده ترین نوع آن، دستگاهی است که لوله های آن ۱۵ تا ۵۰ میلی لیتر ظرفیت داشته و دور دستگاه ۴۰۰۰ دور در دقیقه می باشد. از این وسیله برای جداسازی مواد متفاوت برحسب وزن مولکولی آنهاو نیروی گریز از مرکز استفاده می شود.

### جار بی هوازی:

از این وسیله برای کشت و جداسازی میکروب های بیهوازی مطلق، میکروآئروفیل، کاپنوفیل ها(برای رشدشان نیاز به ۱۰-۵ درصد $CO_2$ دارند) در محیط های مختلف استفاده می کنند. از انجا که حضور اکسیژن هوا برای باکتری های بیهوازی مطلق سمی است معمولا گیرنده نهایی الکترون برای متالبولیسم انرژی در این جنس ها، مواد آلی و معدنی هستند ، لذا برای کشت و جداسازی آنها باید از روش بیهوازی استفاده کرد. این دستگاه یک محفظه شیشه ای درپوش دار است و برحسب نوع آن می توان درب آن را به پمپ خلاء متصل نموده و بعد از قرار دادن کشت حاوی باکتری ها در آن را محکم بسته و با روشن کردن پمپ خلاء هوای درون ظرف را خارج نمود. سپس با استفاده از کپسول های گاز میزان ازت، هیدروژن و گاز کربنیک را برای رشد میکروارگانیسم های بیهوازی تنظیم کرد. اگر پمپ خلاء در دسترس نباشد، می توان درون جار بیهوازی پاکت های خاصی بنام گازپک(Gas Pak) قرار داد. بدین صورت که با اضافه نمودن حدود ۱۰cc آب به آن محیط را مرطوب نموده و در این حالت هیدروژن متصاعد شده با اکسیژن موجود در محیط ترکیب می شود و محیط را فاقد اکسیژن می نماید و شرایط را برای رشد باکتری های بی هوازی فراهم می کند.

## اسپکتروفتومتر:

از این دستگاه برای تعیین کدورت در محلول های حاوی میکروب استفاده می کنند. از آنجا که برای تعیین میزان کدورت، محلول را در برابر نور قرار داده و میزان جذب نور توسط محلول اندازه گیری می شود لذا این دستگاه به نام اسپکتروفتومتر نامیده می شود. از این وسیله می توان برای اندازه گیری میزان نور جذب شده یا نوری که از محلول عبور می کند استفاده نمود وسپس با استفاده از محاسبات میزان باکتری موجود در محلول را بدست آورد. هرچه میزان کدورت محلول بیشتر باشد میزان نور جذب شده نیز بیشتر خواهد شد.

## میکروسکوپ:

اکثر یاخته ها و میکروارگانیسم ها کوچکتر از آنند که با چشم غیرمسلح دیده شوند و برای مشاهده شکل و ساختمان آنها باید از میکروسکوپ استفاده نمود. میکروسکوپ ها دارای انواع مختلفی می باشند و بیشترین میکروسکوپی که در آزمایشگاه ها مورد استفاده قرار می گیرند میکروسکوپ نوری می باشد که شامل اجزای زیر می باشد:

اجزای میکروسکوپ نوری:

میکروسکوپ نوری از پایه(Base) ،صفحه نگهدارنده لام(Stage)، لوله ی بدنه(Bady Tube) ،منبع روشنایی، کندانسور، دیافراگم، عدسی شیء و عدسی چشمی تشکیل شده است.

**پایه(Base):** به اسکلت اصلی میکروسکوپ را پایه می گویند و معمولاً منبع روشنایی در بخش پایه میکروسکوپ قرار می گیرد.

**صفحه نگهدارنده لام(Bady Tube):** این قسمت در بخش فوقانی صفحه نگهدارنده لام قرار دارد و به بازوی میکروسکوپ متصل است. این ساختار دارای سیستم لنزی است که نمونه را بزرگ می نماید. انتهای بالایی لوله شامل لنزهای چشمی یا Ocular است. بخش پایین شامل لنزهای تغییرپذیر شیئی است. قسمت گردان شیئی بالای قسمت باز صفحه نگهدارنده لام قرار دارد. لوله بدنه ممکن است به وسیله پیچ تنظیم بزرگ و کوچک بالا و پایین شود.

**منبع روشنایی:** اکثر میکروسکوپ ها با یک منبع نوری به صورت مستقیم عمل روشنایی را تامین می کند. منبع نوری در بخش پایه قرار گرفته و مستقیما نور را به سمت بالا هدایت کرده و وارد سیستم لنزی می نماید. در برخی از میکروسکوپ ها منبع نوری شامل لامپی در جلوی آینه است اما در میکروسکوپ های جدید منبع نور الکتریکی بوده و لامپ آن از نوع تنگستن و یا تنگستن- هالوژن می باشد.

**کنداسور و دیاگرام:** کندانسور و دیاگرام در زیر صفحه نگهدارنده لام قرار گرفته و شامل دو عدسی است و نوری را که از منبع نوری وارد سیستم لنزی می شود متمرکز و جمع می کند. کنداسور مجهز به دیافراگم کمانی است که به وسیله اهرمی شکست را کنترل می کند و با استفاده از مقدار نور ورودی به سیستم لنزی تنظیم می شود.

**عدسی شیئی:** مهمترین بخش میکروسکوپ نوری عدسی های شیئی هستند که دارای بزرگنمایی ۴- ۱۰- ۴۰و۱۰۰ می باشد مشخصات عدسی های شیئی همانند عدد روزانه ای، فاصله کانونی، بزرگنمایی، طول لوله و.... بر روی بدن ها درج گردیده است.

به هنگام استفاده از شیئی با بزرگنمایی ۱۰۰ جهت وضوح تصویر از روغن ایمرسون در فضای بین عدسی و نمونه استفاده می گردد.

## عدسی چشمی:

مجموعه ای از عدسی هاست که تصویر نهایی از جسم را که توسط عدسی شیئی ایجاد شده به تصویری بزرگتر، مستقیم و مجازی تبدیل می نماید.

## آزمایش مستقیم یا میکروسکوپی(Microscopic examination):

آزمایش میکروسکوپی نمونه های بالینی و مایعات، ترشحات بدن و نسوج، روشی ساده برای تشخیص اولیه بیماری های عفونی می باشد. در بسیاری از موارد، این آزمایش تعیین عامل بیماری زا را بطور دقیق ممکن می سازد. برای مثال می توان بورلیا را در گسترش خون محیطی بیمار مبتلا به تب راجعه تشخیص داد. ضمناً در آزمایش مستقیم باکتری ها را از لحاظ شکل، اندازه، رنگ آمیزی و حرکت مورد مطالعه قرار می دهند. آزمایش میکروسکوپی به دو طریق انجام می شود:

۱. آزمایش میکروسکوپی باکتری های زنده بدون رنگ آمیزی
۲. آزمایش میکروسکوپی باکتری ها پس از رنگ آمیزی

انجام آزمایش های فوق نیاز به وسایلی دارد از جمله:

میکروسکوپ نوری، لام، لامل، چراغ الکلی یا چراغ گاز، آنس، سواب، گیره یا پنس، انواع رنگ های مورد نیاز، روغن.

## ۱- آزمایش میکروسکوپی باکتری های زنده بدون رنگ آمیزی

این روش به منظور مشاهده حرکت باکتری ها، بررسی سلول های موجود در نمونه و گاهی به منظور تشخیص یک باکتری بکار می رود. به طور مثال ترشحات دستگاه تناسلی بیماران مشکوک، جهت تشخیص تروپونماپالیدوم عامل

بیماری سیفلیس روشی شناخته شده است. در این روش ترشحات بیمار را روی لام تمیزی قرار داده و پس از قرار دادن لامل روی نمونه آن را مطالعه می نمایند. در آزمایش میکروسکوپی بدون رنگ آمیزی جهت مشاهده حرکت باکتری ها، باید توجه داشت که باکتری های متحرک در تمام جهات حرکت می نمایند و کاملاً تغییر محل می دهند ، حرکت شناور خود مایع ،باید از حرکت براونی تشخیص داده شود. برای مشاهده حرکت فعال باکتری ها بهتر است روش قطره معلق با استفاده از لام گوده انجام شود.

## ۲- آزمایش میکروسکوپی باکتری ها پس از رنگ آمیزی

با وجود پیشرفت های تکنیکی فراوان در زمینه باکتریولوژی، مطالعه گسترش رنگ آمیزی شده هنوز به عنوان بهترین روش تشخیص فوری عفونت های باکتریال مطرح است. در این روش، بررسی ترشحات، مایعات بدنی نظیر مایع مغزی نخاعی و ادرار از اهمیت خاصی برخوردار است. در این روش علاوه بر مشاهده شکل، شناسایی و پی بردن به اندازه باکتری ها و بررسی سلول های موجود در نمونه، تشخیص فرآیند التهابی نیز امکان پذیر است. مراحل آزمایش میکروسکوپی عبارتنداز:

الف) تهیه گسترش Smear preparation

ب) خشک کردن Drying

ج) ثابت کردن Fixation

د) رنگ آمیزی Staining

### الف) تهیه گسترش

گسترش ممکن است از محیط های کشت مایع، جامد و یا نمونه های بالینی تهیه شود.

## تهیه گسترش از محیط مایع:

لوله آزمایش محتوی مایع را به آرامی تکان داده تا نمونه مخلوط گردد. البته باید توجه داشت که دهانه لوله آلوده نگردد. لوپ را استریل نموده و پس از سرد شدن، داخل مایع کرده یک لوپ پر از مایع برداشته در وسط لام قرار می دهیم و مانند ورقه نازکی می گسترانیم. باید دقت نمود که گسترش خیلی ضخیم یا نازک نبوده و از کناره های لام نیز فاصله داشته باشد.

**الف: تهیه گسترش از محیط جامد:** در وسط لام تمیزی یک قطره سرم فیزیولوژی یا آب گذاشته سپس لوپ را استریل کرده و پس از سرد شدن، مقدار کمی از کلونی باکتری را برداشته و با قطره روی لام، شیرابه یکنواختی تهیه می کنیم. سپس آنها را روی لام می گسترانیم. بطوریکه گسترش ضخیم یا نازک نباشد و از کناره های لام نیز فاصله داشته باشد.

**ب: خشک کردن:** پس از تهیه گسترش صبر می کنیم تا سطح آن در دمای معمولی آزمایشگاه خشک گردد. برای خشک کردن نباید از روش های دیگر استفاده کرد.

**ج: ثابت کردن:** چون ممکن است بر اثر رنگ آمیزی و شستشوی مکرر، باکتری ها از روی لام کنده شوند لازم است گسترش را ثابت نماییم تا بطریقی باکتری ها مرده و به سطح لام بچسبند. برای ثابت کردن از حرارت یا متانول استفاده می شود. روش متداول استفاده از حرارت است. برای این مقصود به آهستگی لام را ۳ یا ۴ مرتبه از روی شعله عبور می دهیم. باید دقت کرد که حرارت زیاد نباشد. چون ممکن است باکتری و سلول ها، تخریب و غیرقابل تشخیص گردند و اگر حرارت کم باشد ممکن است باکتری ها ثابت نشوند. برای در نظر گرفتن حرارت مناسب که حدود ۷۰ درجه سانتیگراد است باید لام را با دست امتحان کنیم. حرارت باید به حدی باشد که دست را نسوزاند.

برای ثابت کردن با الکل، ابتدا روی گسترش الکل متیلیک ریخته ،اضافه آن را خالی نموده و صبر می کنیم تا بقایای الکل تبخیر گردد. بطور کلی ثابت کردن باعث انعقاد پروتئین های باکتری و سلول ها می گردد و به لام می چسبند و شسته نمی شوند.

**د: رنگ آمیزی:** منظور از رنگ آمیزی مشاهده میکروارگانیسم ها با استفاده از میکروسکوپ نوری است.

## اهداف رنگ آمیزی:

۱. نشان دادن میکروارگانیسم ها و سلول های موجود در نمونه
۲. مشاهده اجزایی مانند فلاژل، اسپور، کپسول، دانه های متاکروماتیک و...
۳. تفکیک میکروارگانیسم ها براساس خواصی چون ساختمان شیمیایی دیواره سلول (مثال رنگ آمیزی گرم)

## اصول رنگ آمیزی:

رنگ پذیری به واسطه وجود گروه های کروموفور موجود در رنگ ها می باشد. رنگ ها را براساس ریشه آنیونیک و کاتیونیک به دو دسته رنگ های بازی و اسیدی تقسیم می نمایند. رنگ های اسیدی مانند ائوزین، روز بنگال و فوشین اسیدی، رنگ هایی آنیونیک بوده و دارای بار الکتریکی منفی می باشد، این رنگ ها به علت داشتن بار منفی(-COO) و یا(OH) به اجزایی از سلول که دارای بار مثبت هستند اتصال می یابند.

رنگ های بازی مثل متیلن بلو، فوشین بازی، کریستال ویوله، سافرانین و مالاشیت گرین رنگ های کاتیونیک هستند و به علت داشتن بار مثبت با اجزایی ازسلول که دارای بار منفی می باشند اتصال می یابند. غالباً سطح باکتری دارای خصوصیات اسیدی است. زیرا تعداد زیادی از گروه های کربوکسیل (CooH) در سطح سلول قرار دارد. گروه

های کربوکسیل بنیان های اسیدی در اسیدهای آمینه هستند هزاران اسید آمینه در دیواره یاخته قرار دارد. با یونیزاسیون گروه های کربوکسیل سطح یاخته دارای بار منفی می شود.

به همین دلیل در میکروب شناسی برای رنگ آمیزی، بیشتر از رنگ های بازی (دارای بار مثبت) استفاده می شود و رنگ آمیزی براساس ایجاد پیوندهای یونی بین بارهای مخالف می باشد. رنگ های بازی را بصورت نمک می سازد مانند متیلن بلو که بصورت کلرورمتیلن بلو تهیه می شود و در رنگ آمیزی کلرورمتیلن بلو یونیزه می شود و بخش رنگی آن، متیلن بلو، با سطح یاخته بوسیله ایجاد پیوند یونی واکنش می دهد و باکتری به صورت رنگی (آبی) مشاهده می شود.

## روش های رنگ آمیزی

### ۱- رنگ آمیزی ساده(Simple Staning)

در این نوع رنگ آمیزی تنها از یک رنگ مانند متیلن بلو استفاده می شود. بطور مثال در رنگ آمیزی مایع نخاع و ترشحات مجرای ادراری تناسلی که تشخیص یک باکتری گرم منفی در زمینه قرمز مشکل است از متیلن بلو برای رنگ آمیزی استفاده می کنند. در این روش متیلن بلو را روی گسترش ریخته و پس از یک دقیقه لام را با آب شستشو می دهیم. به این ترتیب کلیه باکتری ها و سلول های موجود در نمونه به رنگ آبی دیده می شوند.

### ۲- رنگ آمیزی منفی(Nagative staining)

در این روش از رنگ هایی مانند نیگروزین یا مرکب چین استفاده می شود. روی لام قطره ای از کشت باکتری را با رنگ مخلوط و گسترش تهیه می نماییم. چون رنگ نمی تواند با داخل باکتری نفوذ نماید، باکتری ها در زمینه سیاه بی رنگ دیده می شوند.

## ۳- رنگ آمیزی افتراقی(Differential Staining)

در این روش از چند محلول رنگی استفاده می شود تا تفاوت موجود بین ترکیبات شیمیایی منجر به افتراق باکتری ها از یکدیگر گردد. در میکروب شناسی پزشکی بیشتر از رنگ آمیزی گرم و اسید فست استفاده می شود.

### الف: رنگ آمیزی گرم(Gram Staining)

برای شناسایی باکتری ها روش های رنگ آمیزی متفاوتی از قبیل گیمسا، اسید فاست و گرم وجود دارد. رنگ آمیزی گرم یکی از متداولترین و مهمترین روش های رنگ آمیزی در میکروبیولوژی است که اولین بار توسط کریستین گرم در سال ۱۸۸۴ ابداع شد. در این رنگ آمیزی باکتری ها بر مبنای رنگ باکتری پس از رنگ آمیزی به دو دسته گرم مثبت و گرم منفی طبقه بندی می شوند. رنگ باکتری پس از رنگ آمیزی به توانایی حفظ رنگ اول و به عبارتی به ساختمان دیواره سلولی باکتری بستگی دارد. در رنگ آمیزی گرم باکتری های گرم مثبت پس از رنگ آمیزی به رنگ بنفش و باکتری های گرم منفی به رنگ قرمز مشاهده می شوند. گرچه هر دو گروه یعنی باکتری های گرم مثبت و منفی دارای دیواره می باشند ولی فرق بین این دو گروه مربوط به خواصی است که در ساختمان دیواره سلولی آنها وجود دارد. اساس ساختمان در دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت یک لایه ضخیمی است از پپتید وگلیکان، ولی در باکتری های گرم منفی ضخامت آن به حداقل می رسد.

### برخی از خصوصیات باکتری های گرم مثبت و گرم منفی:

۱. باکتری های گرم مثبت به طور معمول نسبت به پنی سیلین و مواد رنگی ضد باکتریایی (بازدارنده های رشد باکتری) حساستر از باکتری های گرم منفی هستند.
۲. باکتری های گرم منفی نسبت به مواد اسیدی و قلیایی قوی و نیز نسبت به آنزیم لیزوزیم حساسترند.

۳. باکتری های گرم مثبت به طور معمول اگزوتوکسین تولید می کنند در حالی که گرم منفی دارای اندوتوکسین هستند.

## کاربرد رنگ آمیزی گرم:

از رنگ آمیزی گرم به دو جهت استفاده می شود:

- شناسایی جنس باکتری
- انتخاب آنتی بیوتیک مناسب(باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی نسبت به پنی سیلین G حساسیت بیشتری دارند.)

با این حال همه باکتری ها را نمی توان با رنگ آمیزی گرم مشاهده نمود. فهرستی از باکتری های مهم از نظر پزشکی که با رنگ آمیزی گرم قابل مشاهده نمی باشند در جدول زیر امده است.

| نام باکتری | علت عدم مشاهده با رنگ آمیزی گرم | روش رنگ آمیزی جایگزین |
|---|---|---|
| لزیونلا پنومونیه | عدم دریافت رنگ قرمز سافرانین | طولانی نمودن مرحله افزودن سافرانین در رنگ آمیزی گرم |
| مایکوباکتریوم ها شامل<br>- مایکوباکتریوم<br>- توبرکلوزیس | وجود مقدار زیادی چربی در دیواره سلولی که از نفوذ رنگ جلوگیری می کند. | رنگ آمیزی اسید فاست یا ذیل نلسون |
| - ترپونما پالیدم | نازکتر از آن است که دیده شود | میکروسکوپ زمینه تاریک یا |

| | | |
|---|---|---|
| | | آنتی بادی فلوئورسنت یا فونتاناتری بوندو |
| - مایکوپلاسما پنومونیه | داخل سلولی بوده و دیواره ندارد | روشی وجود ندارد |
| - ریکتزیا | وجود ارگانیسم های درون سلولی | رنگ آمیزی گیمسا یا سایر رنگ آمیزی های بافتی مثل پاپانیکولا |

باکتری گرم مثبت

باکتری ها به دو گروه گرم مثبت و گرم منفی تقسیم می شوند. پوشش سلولی گرم مثبت ها نسبتا ساده بوده و از ۲ تا ۳ لایه تشکیل شده است. غشای سیتوپلاسمی، یک لایه پپتید و گلیکان ضخیم و در بعضی باکتری ها یک لایه به نام کپسول یا لایه S در خارج می باشد.باکتری های گرم مثبت به دلیل داشتن لایه پپتیدو گلیکان ضخیم، نسبت به از دست دادن رنگ کریستال ویوله مقاومت می کنند و در زیر میکروسکوپ به رنگ بنفش مشاهده می گردند.

باکتری گرم منفی

در باکتری های گرم منفی ضخامت لایه پپتیدوگلیکان بسیار کمتر از باکتری های گرم مثبت است ولی در عوض یک لایه ضخیم لیپو پلی ساکاریدی (LPS) بر روی آن قرار گرفته است، در حالی که باکتری های گرم مثبت فاقد آن می باشند. باکتری های گرم منفی به دلیل وجود لیپید در دیواره سلولی و حل شدن آن بوسیله مواد رنگ بر، رنگ کریستال ویوله را به راحتی از دست می دهند و رنگ مرحله آخر رنگ آمیزی گرم، (فوشین یا سافرانین) را به خود می گیرند و در زیر میکروسکوپ به رنگ قرمز مشاهده می شوند.

.

## نکاتی که در رنگ آمیزی گرم باید در نظر گرفته شود:

۱. روش فیکس کردن باید صحیح انجام شود و به اسمیر آسیب نرسد زیرا در نشان دادن گرم مثبت یا گرم منفی بودن اختلال رخ می دهد.

۲. رعایت زمان های رنگ آمیزی: مدت زمان درست انجام شود.

۳. رعایت مدت زمان رنگ بری توسط ماده رنگ بر، زیرا استفاده از زمان طولانی برای رنگ بری سبب متغیر شدن گرم، باکتری می شود. ممکن است باکتری گرم مثبت، گرم منفی به نظر می رسد.

۴. نوع و غلظت ماده رنگ بر: روش تهیه ماده رنگ بر و قدرت و میزان رنگ بری آن مهم است چراکه اگر ماده رنگ بری خیلی قوی باشد ممکن است حالت گرم متغیر پیش آید و باکتری گرم مثبت گرم منفی به نظر برسد.

۵. طریقه درست شست و شوی لام: هیچ وقت از فشار مستقیم آب برای شست و شوی اسمیر استفاده نکنید.

۶. مشخص نمودن پشت و روی لام

۷. در سطح خارجی باکتری های گرم مثبت قشری از نمک منیزیم و ریبونوکلئیک اسید وجود دارد که با کریستال ویوله و لوگل ترکیب پایدارتری ایجاد می کند، که در اثر رنگ بری خارج نمی شود ولی چون گرم منفی ها فاقد این ویژگی هستند در اثر رنگ ماده رنگ بر رنگ خود را از دست می دهند.

۸. PH ایزوالکتریک برای باکتری های گرم مثبت کمتر از گرم منفی هاست، بنابراین گرم مثبت ها ۱۰۰ برابر بیشتر از گرم منفی ها کریستال ویوله را جذب می نمایند.

## روش کار:

ابتدا تهیه اسمیر را انجام می دهیم. یعنی یک لام را برداشته و لوپ را توسط شعله استریل کرده و یک قطره آب روی لام گذاشته و دوباره لوپ را استریل کرده و پس از خنک شدن لوپ، مقداری از کلونی خالص باکتری رااز پلیت برداشته و با آن یک قطره آب مخلوط می کنیم و روی لام گسترش می دهیم. سپس اسمیر را در دمای آزمایشگاه گذاشته تا خشک شود وسپس بوسیله شعله فیکس می نماییم.

**نکته:** در صورتی که گسترش را بیش از اندازه حرارت دهید دیواره یاخته ها آسیب می بیند. بنابراین باکتری های گرم مثبت رنگ کریستال ویوله را از دست می دهند و رنگ سافرانین را جذب می نمایند.

می توانیم جهت راحت به خاطر سپردن ترتیب افزودن مواد کلمه کلاس را به خاطر بسپاریم که هر حرف این کلمه نشانگر ابتدای نام ماده افزودنی می باشد.

ابتدا محلول کریستال ویوله را روی اسمیر ریخته و یک دقیقه صبر می کنیم، پس از گذشت یک دقیقه رنگ را تخلیه کرده و لام را با آب مقطر شست و شو می دهیم. در ادامه و پس از شست و شو با آب، محلول لوگل را روی اسمیر ریخته و به مدت یک دقیقه صبر کرده و دوباره محلول را تخلیه و لام را شست و شو می دهیم. لوگل (ید و یدور پتاسیم) با کریستال ویوله ترکیب شده و ایجاد کمپلکس می نمایند که باعث تثبیت رنگ کریستال ویوله در داخل دیواره سلولی باکتری می شود که هر دو نوع باکتری(گرم مثبت و گرم منفی) نسبت به آن واکنشی یکسان نشان می دهند. پس در این مرحله همه باکتری ها کماکان به رنگ بنفش درمی آیند.

سپس ماده رنگ بر (الکل و استون) را روی لام ریخته و پس از ۵ تا ۱۰ ثانیه شست و شو می دهیم. در باکتری های گرم منفی که دارای لایه های پپتید و گلیکان محدود و غشای خارجی غنی از چربی هستند این حلال باعث حذف این لایه ها و غشا می گردد و باکتری رنگ مراحل قبل را از دست می دهد. ولی در باکتری های گرم مثبت به علت ضخامت زیاد لایه پپتید و گلیکان و عدم وجود لیپید فراوان در غشا رنگ مرحله قبل از غشا خارج نمی شود و در نتیجه پس از این مرحله باکتری های گرم منفی بی رنگ ولی باکتری های گرم مثبت کماکان بنفش خواهند ماند.

نکته مهم این است که باکتری های مورد آزمایش باید جوان باشند (کشت ۲۴-۱۸ ساعته)چرا که بسیاری از باکتری های گرم مثبت در اثر پیر شدن خصوصیت خود را از دست داده و گرم منفی می گردند.

سپس سافرانین را روی گسترش ریخته و پس از ۳۰تا ۴۰ ثانیه شست و شو می دهیم و در آخر لام ها را گذاشته تا خشک شوند و پس از خشک شدن کامل، نمونه را زیر میکروسکوپ گذاشته و با لنز ۱۰۰ با کمک روغن ایمرسیون مشاهده می کنیم.

## نتیجه گیری:

گرم مثبت ها به رنگ بنفش یا آبی به دلیل محلول رنگ کریستال ویوله مشاهده می شود.

گرم منفی به رنگ صورتی مایل به قرمز به دلیل رنگ سافرانین مشاهده می شود.

**نکته:** جهت تشخیص باکتری های گرم مثبت از گرم منفی می توان به روش ذیل نیز عمل نمود:

۱. یک قطره پتاس ۳٪ را روی لام بگذارید و با استفاده از فیلدوپلاتین کلنی باکتری را در قطره مذکور حل نمایید و به آهستگی فیلدوپلاتین را از آن خارج نمایید اگر مایع چسبیده بود و تا ارتفاع ۲-۰/۵ سانتیمتر از سطح لام بلند شد باکتری گرم منفی و در غیر اینصورت گرم مثبت می باشد.

۲. روش دیگر بررسی خصوصیت گرم در باکتری ها استفاده از L. Analine 4 nitroanilide است. در این روش با استفاده از سواب، کلونی باکتری را در معرض این ماده قرار داده که باکتری های گرم منفی در مواجه با آن باعث ایجاد رنگ زرد در سواب می شوند اما کلنی های باکتری های گرم مثبت این گونه نیستند.

**نگاهی به اشکال باکتری ها:**

**کوکوس ها یا باکتری های گرد:**

**دیپلوکوکوسها:**هرگاه تقسیم فقط در یک سطح انجام گیرد و باکتری ها دوبه دو به یکدیگر اتصال داشته باشند آنها را دیپلوکوکوس گویند.

**استرپتوکوکوک:** اگر تقسیمات یاخته ای در یک سطح انجام شود و چند باکتری به دنبال هم قرار گیرند استرپتوکوک می نامند.

**تتراد:** اگر تقسیم در دو سطح عمود بر هم باشد، اشکال چهارتایی بوجود می آید که آن را تتراد می نامند.

**سارسینا:**هرگاه تقسیم یاخته در سه سطح عمود بر هم انجام شود توده های هشت تایی شبیه پاکت پستی بوجود می آید که آن را سارسین می نامند.

**استافیلوکوک:** اگر تقسیمات یاخته به طور نامنظم در سطوح مختلف انجام گیرد اشکالی شبیه به خوشه انگور به وجود می آورد که استافیلوکوک نامیده می شود.

**باسیل ها یا باکتری های میله ای مانند:**

باسیل ها، یعنی باکتری های میله مانند معمولا به صورت دوتایی یا زنجیری دیده می شوند. باکتری های میله ای را از نظر شکل به چند دسته تقسیم می کنند.

- **باسیل کوکوسی:** که کوتاه و شبیه کوکوس است.
- **باسیل دوکی شکل:** که دو انتهای آن گرد است.
- **باسیل رشته ای:** که درازتر از باسیل های معمولی است.

**باکتری های مارپیچی:** باکتری های مارپیچی معمولا منفرد، درازتر، و مارپیچی اند ولی از نظر ابعاد، تعداد و اندازه پیچ ها و حتی سختی دیواره گوناگون هستند.

## روش تهیه کشت میکروبی و آشنایی با انواع محیط های کشت میکروبی:

برای شناسایی باکتری ها در نمونه های بالینی، مراحل کشت، جداسازی و تعیین هویت در آزمایشگاه میکروبیولوژی انجام می گیرد. اکثر باکتری ها براساس مورفولوژی، قابل شناسایی نبوده و باید آنها را در محیط های کشت جدا کرده و سپس براساس خواص بیوشیمیایی و سرولوژیکی تعیین هویت نمود.

روند مطالعاتی باکتری ها به دو عامل بستگی دارد که عبارتنداز :احتیاجات غذایی و نیازهای فیزیکی. برخی از باکتری ها می توانند تحت شرایط مختلفی رشد نموده در حالیکه بعضی نیاز به شرایط خاصی دارند در محیط های کشت باید منابعی چون کربن، نیتروژن، فسفر، گوگرد و املاح معدنی دیگر و فاکتورهای رشد در اختیار باکتری قرار گیرد. باید توجه داشت مقدار این ترکیبات به میزان مشخصی به محیط اضافه شود چون ممکن است افزایش غلظت آنها موجب کاهش و یا عدم رشد باکتری گردد. در ضمن بایستی شرایطی چون درجه حرارت، PH،

نیازهای اتمسفریک و... را نیز در نظرداشت. محیط های آزمایشگاهی را براساس ترکیبات شیمیای و نحوه مصرف به دو صورت طبقه بندی می نمایند:

## الف) طبقه بندی محیط های آزمایشگاهی براساس ترکیب شیمیایی:

بر این اساس، محیط ها به دو دسته **سنتتیک** و **غیر سنتتیک** تقسیم می شوند:

اگر تمام ترکیبات سازنده یک محیط به درستی شناسایی و مقدار آنها نیز مشخص شده باشد به آن محیط سنتتیک گویند که خود به محیط های ساده و محیط های پیچیده طبقه بندی می گردد. محیط های کشت سنتتیک عموماً منابع کربن، انرژی و نیتروژن را در قالب کربوهیدرات ها و اسیدهای آمینه فراهم می نمایند. محیط های سنتتیک ساده حاوی یک منبع کربن و انرژی مانند گلوکز یا لاکتات، یک منبع نیتروژن و نمک های غیرآلی به عنوان بافر هستند، ولی محیط های سنتتیک کمپلکس علاوه بر موارد فوق حاوی اسیدهای آمینه پورین، پیریمیدن و دیگر فاکتورهای رشد هستند. بطور کلی محیط های کشت به سه حالت مایع، جامد و نیمه جامد وجود دارد. محیط های مایع را آبگوشت گویند. جهت ساختن محیط های جامد به محیط به میزان ۲-۱/۵ درصد و در محیط های نیمه جامد به میزان ۰/۵-۰/۲ درصد آگار اضافه می گردد.

**آگار**: پلی ساکاریدی است با زنجیره طویل (کربوهیدرات کمپلکس) که اساساً از واحدهای د گالاکتوپیرانوز ساخته شده و از جلبک دریایی به دست می آید. آگار به وسیله باکتری ها هضم نمی شود، در دمای ۴۸ درجه سانتیگراد به صورت مایع و در دماهای پایین تر شروع به جامد شدن می نماید. آگار به میزان ۲-۱ درصد به آبگوشت اضافه گردیده و این مخلوط پس از استریل شدن سرد می گردد و محیطی جامد بدست می آید که امکان ایزولاسیون و تفریق باکتریها را بر روی سطح خود فراهم می سازد.

**پپتون:** ترکیباتی محلول در آب هستند که از هیدرولیز پروتئین ها بدست می آیند. هیدرولیز معمولاً به وسیله آنزیم های پروتئولیتیک مانند پپسین، تریپسین و پاپایین انجام می شود. قبلاً در آزمایشگاه میکروب شناسی، محیط های کشت به صورت غیرسنتتیک تهیه می شد. اما امروزه محیط ها به صورت تجارتی به فرم پودر یا کریستال در دسترس است که براساس دستورالعمل موجود بر روی شیشه های محیط کشت ساخته می شوند.

محیط های کشت باکتری را از نظر نوع مواد تشکیل دهنده و از نظر کاربرد ، تقسیم بندی می شوند:

## محیط کشت پایه(Basic Media):

این محیط کمترین مقدار موادغذایی برای رشد باکتری ها را دارد و مبنای تهیه انواع و اقسام محیط های کشت می باشد. اکثر انواع باکتری ها در آن رشد می کنند زیرا فاقد ماده ضدمیکروب است مانند محیط نوترینت آگار، نوترینت براث.

## محیط کشت غنی شده(Enrichment Media):

محیط مغذی بوده که دارای مواد تغذیه ای زیادی نظیر ویتامین ها، لیپیدها، اسیدهای آمینه برای رشد باکتری است. بنابراین تعداد زیادی از باکتری ها روی آن بخوبی رشد می کنند. مانند شکلات آگار، بلاد آگار.

## محیط کشت افتراقی(Differetial Media):

محیط کشت تشخیصی بوده که کلونی باکتری های مختلف روی آن کاملاً از همدیگر متمایز می گردد. مانند محیط EMB، Mac این محیط ها دارای املاح صفراوی، قند و معرف شیمیایی هستند که باکتری های لاکتوز مثبت بر روی آنها کلونی های صورتی رنگ و باکتری های لاکتوز منفی نظیر سالمونلا، شیگلا بر روی این محیط ها کلونی های سفید رنگ تشکیل می دهند. از محیط های افتراقی دیگر محیط TSI، سیمون سیترات را می توان نام

برد. این محیط ها برای رشد باکتری های گرم منفی روده ای (انتروباکتریاسه) مناسب هستند. چون وجود املاح صفراوی در محیط مانع از رشد باکتری های گرم مثبت در محیط می شوند.

## محیط کشت اختصاصی(Special Media):

این محیطها برای رشد باکتری های خاصی مناسبند. از این محیط ها برای ایزوله نوع خاصی از باکتری در یک مخلوط میکروبی استفاده می شود. مانند محیط SSآگار که برای جدا کردن سالمونلا و شیگلا بکار می رود یا مانیتول سالت آگار که برای تشخیص گونه بیماری زای استافیلوکوکوس اورئوس استفاده می شود.

## محیط کشت انتخابی(Selective Media):

محیط هایی وجود دارند که دارای یک ماده مهارکننده رشد می باشند این مواد رشد تمام ارگانیسم ها بجر ارگانیسم مورد نظر را مهار می کنند. در مرحله اول از رنگ هایی که دارای خواص ضدمیکروبی هستند استفاده می شود و در مرحله بعد استفاده از آنتی بیوتیک ها و مرحله آخر شامل وارد کردن مواد ترکیبی به محیط کشت جهت فعالیت های متابولیکی ارگانیسم مورد نظر می باشد. از آنجاییکه این محیطها جهت ارگانیسم مورد نظر انتخاب شده اند و برای سایر ارگانیسم ها مضر می باشند آنها را محیط های انتخابی می نامند.مثالی از این نوع محیط ها، محیط کشت فنیل اتیل الکل آگار است که از رشد باسیل های گرم منفی هوازی و بی هوازی اختیاری ممانعت بعمل آورده و به ارگانیسم های گرم مثبت اجازه رشد می دهد.

## محیط کشت انتقال دهنده(Transport Media):

گاهی به علت طولانی شدن فاصله زمان نمونه گیری تا کشت لازم است نمونه را در یک محیط انتقالی که حاوی نمک و بافر است، قرار دهند و به آزمایشگاه بفرستند. در این محیط ها باکتری ها رشد نکرده و در همان تعداد اولیه زنده می مانند.مانند محیط استوآرت (Stuart)- کری بلیر.(Carry Blair)

## ائوزین متیلن بلو(EMB):

این محیط یک محیط انتخابی و افتراقی جهت جداسازی و تشخیص انتروباکتریاسه می باشد.

اساس کار: ائوزین متیلن بلوآگار محیطی است که دارای رنگ های آنیلی مانند متیلن بلو و ائوزین می باشد. این رنگ ها مانع رشد باکتری های گرم مثبت شده و به باکتری های گرم منفی اجازه رشد می دهد، علاوه بر این رنگ ها محیط ائوزین متیلن بلو دارای لاکتوز و ساکاروز نیز می باشد. لاکتوز در محیط فوق باعث تمایز باکتری های لاکتوز منفی از لاکتوز مثبت می شود. اگر باکتری رشد کرده بر روی EMB آگار، قند لاکتوز و یا ساکارز را تخمیر نماید، PH محیط رشد کاهش یافته و موجب رسوب رنگ ها روی کلنی های باکتری می شود. اسید تولید شده موجب تولید کلونی های آبی تیره با جلای فلزی سبز رنگ می شود. کلونی های اشرشیاکلای بدین صورت دیده می شود. تولید اسید کمتر به دلیل تخمیر قندها توسط باکتری ها منجربه ایجاد کلونی های صورتی رنگ می شود زیرا رنگ کمتری بر روی کلونی رسوب می کند. کلونی های تشکیل شده توسط باکتریهایی که قادر به تخمیر این دی ساکاریدها نمی باشند، بی رنگ بوده یا رنگ محیط کشت را به خود می گیرند.

## مک کانکی آگار(Mac conkey agar):

این محیط یک محیط انتخابی و افتراقی می باشد که منجربه تمایز و تشخیص باسیل های گرم منفی روده ای براساس توانایی آنها در رشد روی این محیط کشت و تخمیر لاکتوز می گردد.

این محیط ی انتخابی می باشد زیرا باکتری های گرم مثبت به واسطه وجود کریستال ویوله و نمک های صفراوی موجود در محیط مهار میشوند اما بر روی باکتری های گرم منفی اثری ندارد، وجود لاکتوز نیز این محیط را افتراقی می نماید. زیرا باکتری های تخمیر کننده لاکتوز رااز باکتری های غیرتخمیر کننده به واسطه رنگ کلونی آنها متمایزمی نمایند.معرف موجود در محیط نوترال رد می باشد که باکتری های تخمیر کننده قند به واسطه تولید اسید منجربه ایجاد کلونی های صورتی - قرمز می گردند و کلونی های غیرتخمیر کننده بی رنگ خواهند بود.

**مانیتول سالت آگار Mannitol salt agar):**

این محیط یک محیط کشت انتخابی و افتراقی می باشد. از این جهت انتخابی می باشد که تنها باکتری هایی که تحمل ۷/۵ درصد NaCl را دارند روی این محیط رشد می نمایند. در میان کوکسی های گرم مثبت گونه های استافیلوکوک، میکروکوک و تعداد اندکی از انتروکوک ها تحمل شوری را دارند. وجود قند مانیتول این محیط را اتفراقی می نماید. اسید تولید شده از تخمیر این قند معرف PH فنل رد را از رنگ قرمز به رنگ زرد تغییر می دهد. استافیلوکوک های بیماری زا به دلیل تخمیر قند مانیتول رنگ زرد ایجاد می نمایند ولی استافیلوکوک های غیر بیماری زا هاله زرد رنگ را اطراف کلونی نشان نمی دهند.

**تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت**

**نکات عمومی در مورد محیط های کشت**

**آب:**

کیفیت محیط های کشت بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت بکار می رود. سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه

محیط های کشت شامل وجود یون های مس، قدرت هدایت الکتریکی و PH می باشد. در شرایط ایده آل یون های مس به دلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها نباید در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد. قدرت هدایت الکتریکی آب باید کمتر از ۱۵ میکرو زیمنس باشد و همچنین PH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

## توزین محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی قوطی نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. ظرف محیط کشت را دور از گرما و رطوبت نگهداری کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایی که دارای مواد سمی هستند و تماس طولانی مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت به دقت و بدون ایجاد توده ای از غبار وزن کنید. هرچه زودتر درب ظرف را ببندید. نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید. تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیواره نیز وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است. چون پودر خشک محیط کشت در بالای سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی گردد.

## حل کردن محیط کشت:

محیط های کشت بدون آگار، معمولا با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهد شد. اما محیط های کشت حاوی آگار باید قبل از حرارت دادن به مدت چند دقیقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکلاو کردن حل شود. محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند. محیط های کشتی که نباید اتوکلاو شوند بعد از این مقدار حرارت دادن برای تقسیم داخل پلیت ها یا ظروف دیگر آماده خواهند بود. اکثر محیط های کشت به استریلیزاسیون نهایی در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه نیاز خواهند داشت.

## اندازه گیری و تنظیم PH:

محیط های کشت دهیدراته اگر بطور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم PHندارند. PH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد. اما باید آنها را بعد از سنجش PH دور ریخت. بنابراین بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، مقدار PH را در حد موردنظر (۰/۲±) تنظیم نمایید. تنظیم PH معمولا با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریبا یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) انجام می شود.

## استریلیزاسیون:

بعضی از محیط های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن استریل می شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است. استریلیزاسیون سایر محیط های کشت توسط حرارت مربوط یاصافی غشایی انجام می گردد که این مورد نیز بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است.

الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب: استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد (فشار ۱۵ پوند براینچ مربع) انجام می گیرد. برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را بطور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت وقتی رخ می دهد که مقادیر بیشتر ار دو لیتر محیط کشت باید استریل شود لذا توصیه می شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید. کنترلی کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گردد. از اندیکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارایی اتوکلاو استفاده می کنند اسپور Bacillus Stearothermophilus را می توان نام برد که بصورت تجاری قابل دسترس می باشد.

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی: از صافی غشایی برای استریل کردن محیط های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می شود. استریلیزاسیون بوسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد. از غشاءها و صافی های با قطر منفذ ۰/۲۲ یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاها و صافی هایی که در بسته بندی های استریل به فروش می رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید.

## آماده سازی جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود ۵۰ درجه سانتیگراد برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک(شرایط استریل) در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتیگراد تقسیم نکنید. ترکیبات حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود ۵۰ درجه رسید به آن اضافه شوند. اجازه دهید دمای ترکیب استریل قبل از این که به محیط کشت اضافه شود به دمای اتاق برسد. سپس با رعایت شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده خوب مخلوط کنید و در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند تقسیم نمایید.

## پتری دیش:

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولا پتری دیش ها را با اتیلن اکساید و یا اشعه گاما استریل می کنند. در صورت استفاده از پتری دیش هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی از نظر وجود بقایای این ماده بررسی شود زیرا اتیلن اکساید دارای خاصیت مهارکنندگی برای رشد میکروارگانیسم ها می باشند و می توان آن را با روش کروماتوگرافی اندازه گرفت. در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای

بایستی از پتری دیش هایی از جنس بروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیایی ممکن است موجب آزادسازی قلیا در داخل محیط کشت گردد

## جلسه اول: استافیلوکوک‌ها، میکروکوک‌ها و باکتری‌های وابسته

کوکسی‌های گرم مثبت (gram-positive cocci) یک گروه هتروژنی از باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند. سابقاً جنس *Staphylococcus* به همراه جنس *Micrococcus* در خانواده Micrococcaceae قرار داشتند، اما پس از بررسی‌های فیلوژنتیکی و آنلایزهای شیمیایی در حال حاضر استافیلوکوک‌ها جداگانه در خانواده **"Staphylococcaceae"** قرار داده شده‌اند. براین اساس خانواده Staphylococcaceae به همراه خانواده‌های Bacillaceae، Planococcaceae و Listeriaceae در تیره Bacillales قرار گرفتند. تا کنون بیش از ۳۹ گونه و ۲۱ زیرگونه در جنس *Staphylococcus* شناسایی شده‌اند. باکتری‌های جنس *Micrococcus* نیز در خانواده‌های **"Micrococcaceae"** و **"Dermacoccaceae"** قرار گرفته‌اند.

مهمترین اختلاف بین استافیلوکوک‌ها و میکروکوک‌ها با گروه مهم دیگر کوکسی‌های گرم مثبت یعنی استرپتوکوک‌ها وجود آنزیم کاتالاز در استافیلوکوک‌ها و میکروکوک‌ها و عدم وجود آن در استرپتوکوک‌ها می‌باشد.

**بر همین اساس اولین تست افتراقی در هنگام مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت در نمونه انجام تست کاتالاز برای افتراق جنس‌های استافیلوکوک‌ها و میکروکوک‌ها با استرپتوکوک‌ها می‌باشد.**

- ✓ **تست کاتالاز (Catalase test)**

باکتری های هوازی زمانی که در حال تنفس در زنجیره انتقال الکترون باشند پراکسید هیدروژن یا همان $H_2O_2$ تولید می کنند . این مواد تولید شده برای باکتری‌ها کشنده است و باید تجزیه شود. کاتالاز یکی از آنزیم‌هایی است که برای خنثی کردن این ترکیب سمی واکنش زیر را انجام دهد. به مرور $H_2O_2$ تجزیه و تبدیل به آب و اکسیژن می‌گردد. این عمل تجزیه در محیط بازی سریعتر و در محیط اسیدی کندتر از محیط خنثی صورت می‌گیرد.

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

روش کار: تست کاتالاز روی لام یا در لوله حاوی آگار شیب دار دارای کلنی های تازه انجام می گیرید. زمانی که یک قطره از پراکسید هیدروژن ۳ درصد بر روی کلونی ریخته شود، حباب های گاز اکسیژن از ارگانسیم کاتالاز مثبت تولید می شود. در مورد ارگانسیم کاتالاز منفی هیچ گونه حبابی تولید نمی گردد. هیدروژن پراکسید ناپایدار بوده و به همین دلیل از سویه کنترل مثبت برای تایید آزمایش استفاده می گردد.

نکات مهم

۱. از محیط بلاد آگار نباید استفاده نمود زیرا RBC ها دارای کاتالاز می باشند و ممکن است جواب مثبت کاذب را ایجاد نمایند.
۲. سوزن فیلدوپلاتین بهتر است از جنس کروم – نیکل باشد تا از جنس پلاتین زیرا پلاتین نیز امکان دارد ایجاد جواب مثبت کاذب را نماید. در صورت نیاز میتوان از اپلیکاتور پلاستیکی یا چوبی استفاده کرد.
۳. $H_20_2$ در مقابل نور به راحتی تجزیه می شود بنابراین در شیشه رنگی و در یخچال نگهداری میشود.

## افتراق استافیلوکوک‌ها از میکروکوک‌ها

استافیلوکوک‌ها کوکسی گرم مثبت خوشه ای، کاتالاز + اکسیداز – و فاقد حرکت و پیلی می باشد. برخی از گونه‌های این جنس دارای کپسول پلی ساکاریدی بوده و در شرایط هوازی و بی هوازی اختیاری رشد می کنند. این گروه از باکتری های عامل ۸۰٪ از عفونت های چرکی می باشند. این باکتری به حرارت و خشکی مقاومت نسبی دارد به طوری که می گویند استافیلوکوک ها تنها باکتری گرم + فاقد اسپور مقاوم می باشد. استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان پاتوژن بالقوه بوده و سایر اعضای این گروه فرصت طلب می باشند. اکثر عفونت های استافی همراه با آبسه است. این باکتری بعد از E.coli دومین عامل مهم در عفونت های بیمارستانی می باشد. استافیلوکوک‌ها از نظر متابولیسمی اختیاری بوده و فاقد توانایی تولید گاز می باشند.

میکروکوک‌ها کوکسی های گرم+ و کمی بزرگتر از استافیلو کوک ها هستند که به صورت دوتایی تتراد یا خوشه های نا منظم دیده می‌شوند. بدون اسپور و بندرت متحرک و بر خلاف استافیلوکوک‌ها هوازی مطلق هستند.کلنی آنها معمولا پیگمانهای رنگی زرد تا نارنجی تولید میکنند. میکروکوک‌ها در طبیعت فراوانند به طوری که در محیط پراکنده بوده و به عنوان فلور نرمال پوست و نقاط

مختلف بدن اهمیت دارند. به ندرت در اثر ضعف سیستم ایمنی بدن می‌توانند ایجاد بیماری نموده و به عنوان میکروارگانیسم فرصت طلب عمل نمایند. از آنجا که میکروکوک‌ها فلور پوست بوده و همچنین در محیط به فراوانی دیده می‌شوند و از طرفی از نظر ظاهری بسیار شبیه استافیلوکوک‌ها بوده و همانند آنها کاتالاز مثبت می‌باشند، میکروکوک در ایجاد اشتباه حین تشخیص استافیلوکوک‌ها بسیار دارای اهمیت هستند. بنابراین باید این دو جنس از هم افتراق داده شوند. مهمترین تفاوت بین میکروکوک‌ها و استافیلوکوک‌ها عدم توانایی تخمیر قند گلوکز در میکرکوک‌ها می‌باشد.

جدول زیر تست‌های تشخیصی افتراقی بین میکروکوک‌ها و استافیلوکوک‌ها را بیان کرده است.

| وجه تمایز | میکروکوک | استافیلوکوک |
|---|---|---|
| رشد بی هوازی | − | + |
| رشد در محیط OF | O+/F−* | O+/F+ |
| حساسیت به باسیتراسین | S** | R** |
| حساسیت به لیزوزیم | S | R |
| حساسیت به فورازولیدین | R | S |
| حساسیت به لیزواستافین | R | S |
| اکسیداز | + | − |

*O: oxidative F: fermentative

**S: Sensitive حساس R: Resistant مقاوم

- ✓ **تست اکسیداز ( oxidase test)**

از این تست برای افتراق باکتری‌های دارای آنزیم سیتوکرم اکسیدازc و فاقد این آنزیم استفاده می‌شود. در تشخیص این آنزیم، از محلولهایی استفاده می شود که در حالت عادی بی رنگ بوده و بعد از اکسیده شدن رنگی می شوند. معرف این تست محلول تترامتیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید می باشد . یکی از کاربردهای تست اکسیداز برای افتراق میکروکوک‌ها که اکسیداز مثبت بوده از استافیلوکوک‌ها که اکسیداز منفی هستند، می‌باشد .

روش کار: معمولا از یک دیسک آغشته به معرف برای این تست استفاده می‌شود. یک قطره سرم فیزیولوژی روی دیسک ریخته و مقداری کلنی روی آن قرار دهید. در صورتی رنگ دیسک تغییر کند و بنفش رنگ شود اکسیداز مثبت بوده ومعرف را اکسیده می کند. تست مثبت: ایجاد رنگ بنفش بر روی دیسک

تست منفی: عدم تغییر رنگ دیسک

- ✓ **تست OF (oxidative-fermentative (OF) test)**

یکی از مهمترین صفات مهم برای شناسایی باکتری‌های هوازی مطلق از باکتری‌های هوازی- بیهوازی اختیاری، توانایی ارگانیسم جدا شده در نوع استفاده از کربوهیدراتها می باشد که با آزمایش OF انجام می گیرد .در این آزمایش از محیطی به نام Oxidative Fermentative(OF) که دارای مقادیر بسیار کمی پپتون است استفاده می گردد. برای کشت برروی این محیط از دو لوله استفاده می شود. ارگانیسم جدا شده را در هر دو محیط تلقیح کرده و سپس یکی از محیط ها را با پارافین استریل پوشانده که شرایط بی هوازی ایجاد شود. بعد از گرماگذاری در لوله هایی که رنگ زرد ایجاد شده، اسید تولید و گلوکز مصرف شده است. در لوله واجد پارافین (شرایط بی هوازی) عمل تخمیر و در لوله فاقد پارفین ( شرایط هوازی) عمل اکسیداسیون صورت می گیرد. باکتریهای هوازی بیهوازی اختیاری (مثل استافیلوکوک‌ها) در هر دو لوله تغییر رنگ ایجاد می کنند. باکتریهای هوازی مطلق (مثل میکروکوک‌ها) فقط در شرایط هوازی یعنی در محیط بدون پارافین ایجاد اسید می کنند. باکتریهایی که گلوکز را از هیچ یک از طرق فوق مصرف نمی نمایند را غیراکسید کننده می گویند.

- ✓ **تست حساسیت به باسیتراسین**

باسیتراسین یک آنتی بیوتیک بوده که از طریق تداخل‌در ساخت دیواره سلولی بر علیه اغلب باکتری‌های گرم مثبت (از جمله استرپتوکوک‌ها وکلستریدیا) مؤثر است. از تست حساسیت به باسیتراسین برای افتراق استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A از سایر استرپتوکوک ها (فصل استرپتوکوکاسه) و همچنین میکروکوک‌ها از استافیلوکوک‌ها استفاده می‌شود. کلنی ایزوله مشکوک را در یک پلیت بلادآگار با لوپ استریل به صورت کشت خطی روی پلیت کشت می دهیم. یک دیسک باسیتراسین را روی ناحیه کشت

داده شده، قرار می دهیم. باید توجه نمود که دیسک از لبه پلیت فاصله داشته باشد. پلیت را در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار می دهیم.

حساسیت به باسیتراسین: مشاهده یک هاله عدم رشد در اطراف کلنی باکتری¬ها

مقاومت به باسیتراسین: رشد کامل در محیط و عدم تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری¬ها

## گونه‌های مهم استافیلوکوکها

تمام گونه‌های این باکتری مقاوم به باسیتراسین ولی در مقابل حساس به لیزواستافین و فورازولیدین می باشد. همچنین همه آنها اکسیداز منفی هستند.

### I) استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)

استافیلوکوکوس اورئوس (استافیلوکوک طلایی) گاهی اوقات ایجاد پیگمان طلایی رنگ می کند و علت نام گذاری این باکتری به دلیل رنگ پیگمان آن است. تولید پیگمان در ۲۴ درجه سلسیوس رخ می‌دهد. کلنی *S. aureus* دارای قطر ۱ تا ۳ میلی‌متر بوده و دارای تحمل به نمک تا غلظت ۱۰٪ می‌باشد. این گونه کواگولاز مثبت می باشد و در محیط جامد به صورت خوشه ای رشد می کند. این ارگانیسم هوازی و بی هوازی اختیاری است. استافیلوکوکوس اورئوس در محیط بلاد آگار به صورتβ همولتییک رشد میکند (دارای همولیز کامل بوده) و توانایی تخمیر قند مانیتول در محیط مانیتول سالت اگار را دارد. این باکتری کواگولاز و DNase مثبت بوده و وجود این دو آنزیم مهمترین وجه افتراق این گونه از سایر گونه‌های استافیلوکوک‌ها می‌باشد. این گروه فلور نرمال بینی ،ناحیه پرینه ،بند ناف بچه ، axilla و Throat می باشند.

- ✓ **تست کواگولاز**

استافیلوکوک‌ها دو نوع کواگولاز تولید می‌کنند که در بیماری زایی باکتری و تولید آبسه نقش اساسی دارد. نوع اول که کواگولاز آزاد است یک آنزیم پروتئینی و ترشحی بوده که در حضور یک فاکتور پروتئینی دیگر به نام (CRF) coagulase-reacting factorکه در پلاسمای میزبان وجود دارد، با اثر بر روی فیبرینوژن آن را به رشته‌های فیبرین تبدیل می‌کند. نتیجه این واکنش ایجاد لخته می‌باشد.

نوع دوم کواگولاز به نام کواگولاز متصل(Bound coagulase) یا یا فاکتور جمع کننده **(clumping factor)** مطرح می‌باشد به دیواره سلول باکتری متصل است. این فاکتور پروتئینی با اتصال مستقیم به فیبرینوژن پلاسما موجب ایجاد آگلوتیناسیون ارگانیسم‌ها در اثر اتصال آنها به یکدیگر و در نتیجه ایجاد لخته می‌شود. به استثناء گونه‌ای جدیداً شناسائی شده استافیلوکوکوس لوگدوننسیس ( *S. lugdunensis*) ، که فاکتور جمع کننده آن مثبت بوده اما کوآگولاز منفی است، تمام ارگانیسم هائی که فاکتور جمع کننده تولید می‌کنند، آنزیم کوآگولاز نیز دارند و احتمالاً به عنوان استافیلوکوک اورئوس شناسائی می‌شوند. تمام سوش‌های استافیلوکوک اورئوس با اینکه دارای فاکتور جمع کننده هستند واکنش مثبت را نشان نمیدهند، چرا که برخی سویه‌ها با داشتن کپسول ضخیم و پوشیده شدن سطح سلول مانع از در معرض قرار گرفتن فاکتور جمع کننده قرار می‌گیرند. در مقایسه استاف اپیدرمایدسیس و استاف ساپروفیتیکوس کوآگولاز منفی می باشند.

نحوه انجام تست: پلاسمای خرگوش با EDTA نسبت به پلاسمای انسانی جهت انجام آزمایش کوآگولاز آزاد و متصل ترجیح داده می‌شوند، زیرا پلاسمای انسانی ممکن است دارای فاکتورهای مهار کننده واکنش باشند. در ضمن بهتر است از پلاسمای سیتراته استفاده نشود؛ چرا که برخی ارگانیسم‌های آلوده کننده محیط با تجزیه سیترات باعث آزاد شدن کلسیم پلاسما و متعاقب آن ایجاد لخته در پلاسما می‌شوند و بنابراین در نتیجه آزمایش تداخل ایجاد شده و جواب مثبت کاذب ایجاد می شود..

۱. تست کواگولاز اسلایدی: برای بررسی فاکتور جمع کننده جهت شناسائی احتمالی استافیلوکوک اورئوس ابتدا یک قطره از پلاسمای خرگوشی حاوی EDTA بر روی یک اسلاید تمیز می‌گذارید. در کنار قطره پلاسما یک قطره آب مقطر به عنوان کنترل منفی قرار دهید. سپس با یک لوپ یا اپلیکاتور دو یا سه کلنی بر داشته و جداگانه در دو قطره حل می‌کنید. سپس اسلاید را به آرامی تکان داده و قرائت نتیجه را طی ۱۰ ثانیه انجام می‌دهیم.

تست مثبت: ایجاد لخته در قطره پلاسما و مشاهده این شکل در قطره آب

تست منفی: عدم ایجاد هرگونه لخته در دو قطره

۲. تست کواگولاز لوله‌ای: در شرایط استریل به وسیله پیپت پاستور استریل یا سرنگ استریل 0.5ml از پلاسمای خرگوشی حاوی EDTA را درون یک لوله ریخته و سپس چند کلنی از باکتری مورد نظر را درون آن حل کرده و یک سوسپانسیون

غلیظ درست می‌کنیم. لوله را در انکوباتور در مای ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده و طی مدت ۴ ساعت نتیجه را قرائت می‌کنید.

نکته۱ : اگر لوله‌ها بیش از ۲۴ ساعت در انکوباتور بمانند ممکن است که لخته‌ها توسط آنزیم‌های تجزیه کننده فیبرین باز شده و منفی کاذب حاصل شود.

نکته۲: اگر پس از ۴ ساعت نتیجه منفی شد لوله‌ها را یک شب در دمای اتاق انکوبه کرده و سپس نتیجه را بررسی می‌کنیم.

تست مثبت: ایجاد لخته لوله

تست منفی: سیال بودن لوله

- ✓ **تست DNase**

آنزیمی که تجزیه DNA به قطعات کوچکتر را کاتالیز می کند، دزوکسی ریبونوکلئاز یا DNase نام دارد. تست DNase برای تشخیص باکتری هایی که قادرند به تولید این اگزوآنزیم می باشند، مورد استفاده قرار می گیرد. تست DNase همراه با تست های دیگر( مانیتول سالت آگار و کوآگولاز) جهت شناسایی *S. aureus* به کار گرفته می شود. استرپتوکوک گروه A و سراشیا مارسسنس (بیماری زای فرصت طلب) نیز تولید آنزیم خارجی سلولی DNase می نمایند. توانایی باکتری برای تولید این آنزیم با کشت آن در محیط DNase آگار مشخص می شود. باکتری هایی که دارای آنزیم DNase باشند هاله ی شفافی در اطراف کلنی آنها نمایان می گردد.

روش کار

۱. در شرایط استریل یک لوپ پر از باکتری رشد کرده در محیط کشت مایع یا مقدار کمی از کلونی باکتری در محیط کشت آگار شیب دار را به صورت خطی در سطح کشت DNase آگار تلقیح کنید.

۲. پلیت تلقیح شده را به صورت وارونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه کنید.

۳. پس از انکوباسیون مقدار3.8 از محلول HCL بر روی پلیت بریزید. پلیت را از نظر ایجاد هاله شفاف در اطراف کلونی باکتری بررسی کنید.

تست مثبت: وجود هاله شفاف دراطراف خط رشد باکتری

تست منفی: عدم وجود هاله شفاف اطراف کلونی باکتری

- ✓ **تست بررسی تخمیر قند مانیتول و تحمل نمک ۷,۵٪ در محیط مانیتول سالت آگار (Mannitol salt agar)**

یک تست دیگر برای افتراق گونه *S. aureus* از سایر اعضای غیر بیماری زای جنس استافیلوکوک توانایی تخمیر قند مانیتول و تحمل نمک ۷,۵ درصد در *S. aureus* و عدم توانایی تخمیر قند فوق و عدم تحمل نمک در سایر گونه‌های استافیلوکوک می‌باشد. برای بررسی این دو ویژگی از محیط مانیتول سالت آگار یا چاپمن آگار استفاده می‌شود.

این محیط یک محیط کشت انتخابی و افتراقی می‌باشند. از این جهت انتخابی می‌باشد که تنها باکتری هایی که تحمل ۷,۵ درصد NaCl را دارند روی این محیط رشد می‌نمایند. در میان کوکسی های گرم مثبت علاوه بر *S. aureus* ، میکروکوک و تعداد اندکی از انتروکوک ها تحمل این مقدار نمک را دارند. وجود قند مانیتول این محیط را افتراقی می‌نماید. اسید تولید شده از تخمیر این قند معرف pH فنل رد را از رنگ قرمز به رنگ زرد تغییر می‌دهد. *S. aureus* این فنوتیپ را روی این محیط نشان می‌دهند ولی استافیلوکوک‌های غیر اورئوس هاله زرد رنگ را اطراف کلنی نشان نمی‌دهند.

روش کار :

۱. در شرایط استریل یک لوپ پر از باکتری رشد کرده را در محیط کشت مانیتول سالت آگار به روش کشت خطی تلقیح کنید.

۲. پلیت تلقیح شده را به صورت وارونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵درجه سانتگراد گرمخانه گذاری کنید.

۳. پلیت را از نظر رشد باکتری ها و رنگ محیط کشت اطراف باکتری ها بررسی کنید.

تست مثبت: رشد باکتری در محیط (تحمل نمک ۷,۵٪) و تغییر رنگ محیط از قرمز روشن به زرد(به دلیل تخمیر مانیتول)

تست منفی: عدم رشد باکتری یا رشد ضعیف ( عدم تحمل نمک ۷,۵٪) و عدم تغییر رنگ محیط به زرد (به دلیل عدم تخمیر مانیتول)

- ✓ **تست بررسی همولیز بتا**

دیگر ویژگی افتراقی استافیلوکوک‌های بیماری زا مثل *S. aureus* از سایر گونه‌های استافیلوکوکی غیر بیماری‌زای ایجاد همولیز بتا در محیط بلاد آگار توسط سویه‌های *S. aureus* می‌باشد. ایجاد انواع همولیز در محیط بلاد آگار در فصل استرپتوکوکاسه شرح داده خواهد شد.

### II) استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس (*Staphylococcus epidermidis*)

این ارگانیسم مانند سایر گونه‌های استافیلوکوک‌ها کوکسی گرم +، اکسیداز- ، کاتالاز+ و تخمیر کننده گلوکز در شرایط بی‌هوازی می‌باشد. این باکتری شایع ترین فلور نرمال پوست بوده و بیشترین جمعیت حضور آن در کشاله ی ران است. این باکتری در ساختمان خود دارای گلیسرول تئی کوئیک اسید می باشد که بنام (پلی ساکارید B) مطرح است علاوه بر آن دارای کپسول نیزمی باشد.

*S. epidermidis* در افراد دارای دریچه مصنوعی قلب و همچنین در بیمارانی که پروتزهای داخلی دارند می‌تواند سبب ایجاد اندوکاردیت، سپتی‌سمی و سایر عفونت‌ها شود. همچنین از آنجا که این باکتری فلور نرمال بر روی پوست می‌باشد می‌تواند در تشخیص گونه *S. aureus* تداخل ایجاد کند. بر خلاف *S. aureus* فاقد کواگولاز و DNase، فاقد توانایی ایجاد همولیز بتا و همچنین فاقد قدرت تخمیر مانیتول و نمک ۷,۵٪ می‌باشد. البته برخی سویه‌های این باکتری با تحمل نمک می‌توانند در محیط مانیتول سالت آگار رشد کرده ولی قدرت استفاده از مانیتول را نداشته و رنگ محیط را به زرد تبدیل نمی‌کنند. در برخی از سویه ها هیالورونیداز تولید می کند و مانند استاف اورئوس فسفاتاز + است. حساس به نوبیوسین و مقاوم به پلی میلکسین ونیازمند بیوتین برای رشد می باشد.

### III) استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (*Staphylococcus saprophyticus*)

این ارگانیسم فلور نرمال دستگاه تناسلی ادراری خانم ها می باشد و منجر به ایجاد عفونت های ادرای در خانم های فعال از نظر جنسی می گردد. این ارگانیسم مانند سایر گونه‌های استافیلوکوک‌ها کوکسی گرم +، اکسیداز- و کاتالاز+ می‌باشد. بر خلاف *S. epidermidi* و *S. aureus* مقاوم به نوبیوسین می‌باشد. همچنین *S. saprophyticus* بر حلاف *S. epidermidi* به اسید نالدیستیک حساس است.

- ✓ **تست حساسیت به نوبیوسین**

باکتری رشد کرده بر روی محیط براث یا آگار را و بوسیله لوپ یا سواب استریل در سطح یک محیط کشت مثل نوترینت آگار کشت می‌دهیم. سپس با پنس یک دیسک نوبیوسین را روی منطقه ۱ کشت قرار می دهیم و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط را مورد بررسی قرار می دهیم.

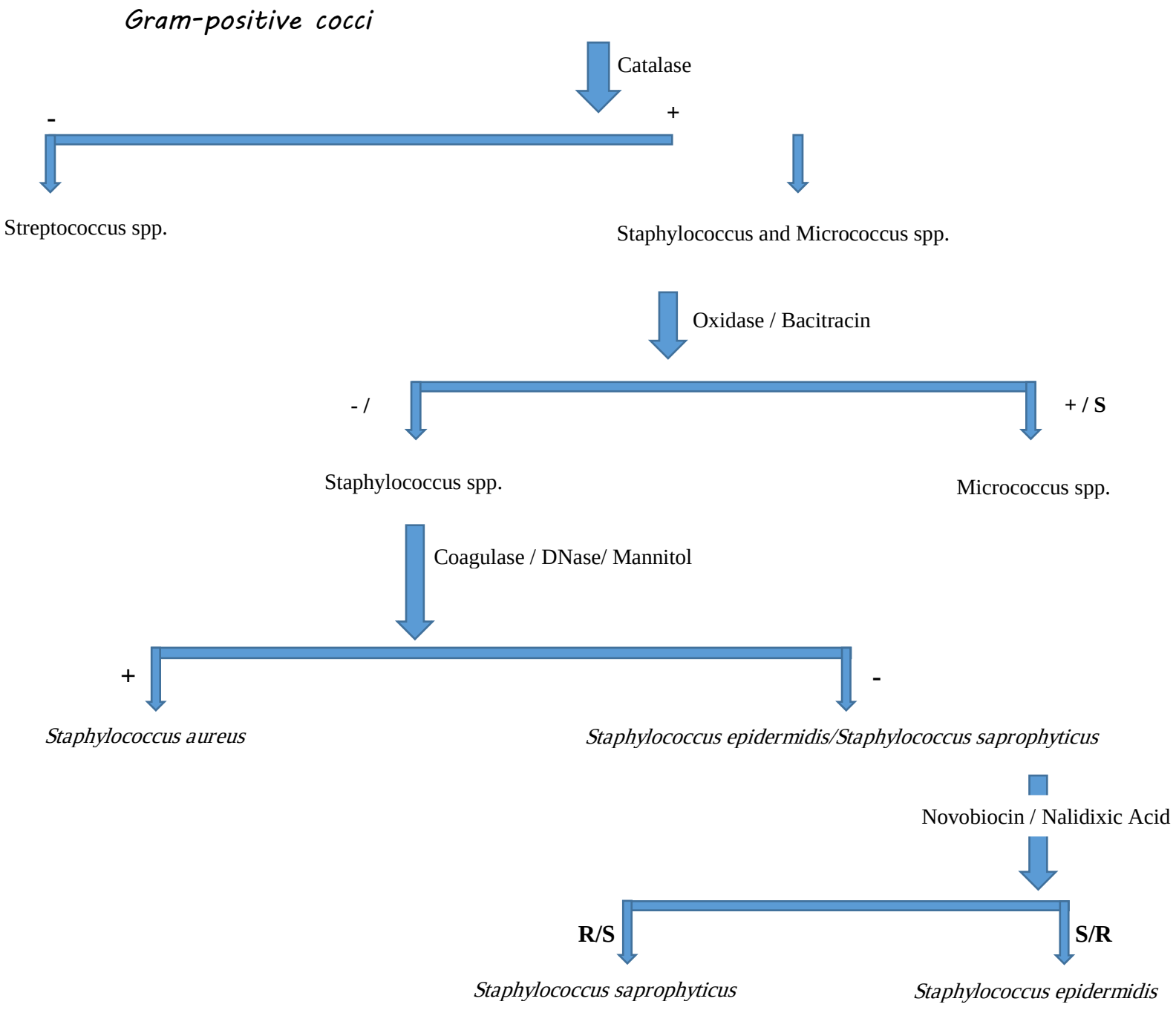
حساسیت به نوبیوسین: مشاهده یک هاله عدم رشد در اطراف کلنی باکتری‌ها

مقاومت به نوبیوسین: رشد کامل در محیط و عدم تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری‌ها

جدول زیر مهمترین تست‌های افتراقی بین استافیلوکوک‌ها و همچنین میکروکوک‌ها را نشان می‌دهد.

| | *s. aureus* | *S. epidermidis* | *S. saprophyticus* | **Micrococcus spp** |
|---|---|---|---|---|
| **کاتالاز** | + | + | + | + |
| **همولیز بتا** | + | – | – | – |
| **تولید اسید از مانیتول** | + | – | (+)یا(–) | – |
| **تحمل نمک ۷٫۵٪** | + | – | – | + |
| **کواگولاز** | + | – | – | – |
| ***DNase*** | + | – | – | – |
| **حساسیت به نوبیوسین** | S | S | **R** | **S** |
| **حساسیت به باسیتراسین** | R | R | R | **S** |

شکل زیر شمای ساده‌ای از افتراق گونه‌های استافیلوکوک‌ها از هم و همچنین از استرپتوکوک‌ها و میکروکوک‌ها نشان می‌دهد.



## جلسه دوم: خانواده استرپتوکوکاسه

این گروه از باکتری ها در کل ۱۲ جنس کوکسی گرم مثبت کاتاز منفی می باشند از مهم ترین آنها ۶ جنس رامی توان نام برد که عبارتند از : استرپتوکوک، انتروکوک، آئروکوک، پدیوکوک، جملا (ژملا)، لوکونوستوک، که از این میان پاتوژن های انسانی شامل استرپتوکوک،انتروکوک و آئروکوک می باشد.

## جنس استرپتوکوکوس

کوکسی گرم مثبت و با اندازه تقریبا ۰/۵-۱ میکرون با ارایش زنجیره ای یا دوتایی قرار می گیرند طول این زنجیره ها به شرایط محیطی باکتری بستگی دارد. این گروه کاتالاز- و فاقد اندوسپور بوده و توانایی احیای نیترات را دارند. دمای اپتیمم رشد آنها ۳۷ درجه است. انگل مهره داران بوده و در دهان و دستگاه گوارش زندگی میکنند و بعضی از گونه ها پاتوژن انسان و حیوان هستند. رشد اکثر ارگانیسم های این گروه بی هوازی اختیاری است. برخی از باکتری های موجود در این گروه نیازمند $Co_2$ برای رشد هستند (کاپنوفیل) مانند : *S. pneumoniae*، *S. mutans* و *S. anginosus*. برخی از گونه‌های استرپتوکوک‌ها می‌توانند بیماری‌هایی مانند فارنژیت استرپتوکوکی (گلودرد چرکی)، مننژیت، نومونی (ذات الریه)، اندوکاردیت، بادسرخ و فاسئیت نکروزان (قانقاریا) را ایجاد کنند. با این وجود، بیشتر گونه‌های استرپتوکوک، غیربیماریزا هستند و به عنوان فلور (همزیست) دهان، پوست، روده و سیستم تنفسی فوقانی محسوب می‌شوند. همچنین استرپتوکوک‌ها به عنوان یکی از اجزای ضروری تولیدفراورده های لبنی مثل پنیر و ماست به حساب می‌آیند.

استرپتوکوک‌ها بر اساس ویژگی‌های همولیتیک (همولیز خون در محیط بلاد آگار) طبقه بندی می‌شوند. گونه‌های آلفا همولیتیک موجب اکسیداسیون هموگلوبین در گلبول‌های قرمز می‌شوند و آگار خون دار را سبزرنگ می‌نمایند. گونه‌های بتاهمولیتیک موجب از هم گسیختگی و لیز کامل گلبول‌های قرمز می‌شوند بطوریکه ناحیه‌ای عاری از گلبول‌های قرمز در اطراف کلنی باکتری در آگار خون دار دیده خواهد شد. گونه‌های گاما همولیتیک، هیچ نوع همولیزی تولید نمی‌کنند.

گونه‌های استرپتوکوک‌ها، با استفاده از سروتیپ بندی لنسفیلد (Lancefield serotyping) نیز تقسیم بندی می‌شوند. این تقسیم بندی بر اساس حضور وجود کربوهیدارت‌های خاصی در دیواره سلولی باکتری است تاکنون ۲۰ سروتیپ لنسفیلد یعنی ازA تا Vغیر از I و Jتوصیف شده‌است.

از دیدگاه پزشکی، مهمترین استرپتوکوک‌ها عبارتند از گروه آلفا همولیتیک (استرپتوکوک نومونیه و استرپتوکوک‌های ویریدانس)، گروه بتا همولیتیک (استرپتوکوک‌های گروه A لانسفیلد و استرپتوکوک‌های گروه B لانسفیلد).

نکته مهم در مورد استرپتوکوک‌ها این است که این باکتری ها به دلیل فقدان کاتالاز به شدت به $H_2O_2$ تولیدی خودشان و محیط حساس هستند و لیز میشوند. لذا در برای کشت آنها در آزمایشگاه باید حتما یک منبع کاتلاز همچون RBC در محیط کشت وجود داشته باشد. لذا برای رشد استرپتوکوک‌ها معمولاً از محیط بلادآگار گوسفندی (تریپتیس سوی آگار حاوی ۵٪ خون گوسفند) استفاده می‌شود.

- ✓ **تست همولیز**

۱- همولیز بتا : Beta hemolysis درصورتیکه دراطراف کلنی لیز کامل گلبولهای قرمز به صورت هاله ای شفاف برروی اگار خوندار مشاهده شود باکتری را بتاهمولیتیک می نامند . همولیز بتا دراثر ترشح آنزیم همولیزین توسط باکتری بوجود می اید.

۲- همولیز الفا : Alpha hemolysis درصورتیکه دراطراف کلنی هاله نیمه شفاف وسبزرنگ ایجاد شده باشد همولیز را الفا می نامند. دراین حالت باکتری باترشح مواد اکسید کننده مخصوصا $H_2O_2$ باعث تبدیل هموگلوبین به مت هموگلوبین می کردد .

۳- همولیز گاما :Gamma reaction درصورتیکه دراطراف باکتری هیچ گونه همولیزی برروی اگار خوندار ایجاد نکردد گاما همولیتیک نامیده می شود.

## استرپتوکوکوس های β همولیتیک گروه A (GAS)

مهمترین گونه استرپتوکوک‌های گروه A، استرپتوکوک پایوژنز(*S. pyogenes*) است. این باکتری عامل، گلودرد چرکی، تب روماتیسمی، مخملک، گلومرولونفریت حاد، فاسئیت نکروزان(قانقاریا) است. این باکتری، توکسین‌هایی تولید می‌کند که موجب

تخریب بافتهای مختلف بدن می‌شود.کوکسی گرم مثبت ، کاتالازمنفی بوده و رشد بی هوازی اختیاری، فاقد پیلی و فلاژل، دارای کپسول از جنس هیالورونیک اسید و مهمتر از همه $\beta$ همولتیک می باشند. این ارگانیسم در نازوفارنکس مستقر بوده و انگل اجباری و مختص انسان است. سایر استرپتوکوک‌هایی که آنتی ژن گروه A را دارند عبارتند از استرپتوکوک دیسگالاکتیه ( *S. dysgalactiae*) و استرپتوکوک آنژینوسوس (*S. anginosus*). باکتری‌های اخیر، غیرشایع هستند و ما به آنها نمی‌پردازیم.

خصوصیات آزمایشگاهی *S. pyogenes*: کاتلاز منفی، بتا همولیتیک، حساس به باسیتراسین،PYR مثبت و مقاوم به کوتریموکسازول.

- ✓ **تست حساسیت به باسیتراسین**

از دیسک باستیراسین بر روی محیط بلاد آگار که باکتری مورد نظر کشت داده شده است، استفاده میکنیم. بعد از ۲۴ ساعت اگر هاله عدم رشد ایجاد شده باشد حساس به آنتی بیوتیک بوده ولی اگر هاله ایجاد نشود مقاوم به انتی بیوتیک می‌باشد. در بین استرپتوکوک‌ها *S. pyogenes* به باسیتراسین حساس است.

- ✓ **تست PYR**

استرپتوکوک پایوژنز وگونه‌های انتروکوک قادر به هیدرولیز سوبستایPYR یا همان L پیرولیدونیل- بتا نفتیل آمید بواسطه آنزیم اِل- پیروگلوتامیل آمینوپپتیداز می‌باشند. این آزمایش از آزمایش باسیتراسین که یک شب طول کشیده و جهت شناسائی احتمالی استرپتوکوک گروه A (استرپتوکوک پایوژنز) به کار می رود، اختصاصی تر می‌باشد.

اصول آزمایش: گونه‌های استرپتوکوک پایوژنز و انتروکوک، آنزیم اِل – پیروگلوتامیل آمینوپپتیداز دارند. این آنزیم سوبسترای آمیدی را به بتا – نفتیل آمین هیدرولیز می‌کند. بتا – نفتیل آمین در مجاورت معرف سینامالدئید با آن ترکیب شده و یک محصول رنگی قرمز روشن را بوجود می‌آورد.

روش انجام آزمایش: مقدار کمی از کلنی مورد آزمایش را بر سطح دیسک آغشته به معرف PYR بمالید (این دیسک‌ها به صورت تجارتی وجود دارند). استرپتوکوک پایوژنز موجب تغییر رنگ قرمز روشن در طی ۵ دقیقه می‌شود. اما ارگانیسم هائی که فاقد آنزیم اِل پیروگلوتامیل آمینوپپتیداز هستند (مثل استرپتوکوک آگالاکتیه) به رنگ نارنجی یا بدون تغییر رنگ باقی خواهند ماند.

## استرپتوکوک های گروه B (GBS) / استرپتوکوک آگالاکتیه *S. agalactiae*

*S. agalactiae* تنها جنس گروه B استرپتوکوک‌ها می‌باشد، لذا اگر از استرپتوکوک گروه B نام برده شد منظور همان *S. agalactiae* می‌باشد. *S. agalactiae* ساکن طبیعی روده و بخش ابتدایی دستگاه تناسلی در زنان می باشد. عامل نومونی و منتژیت در نوزادان و گاهی اوقات باکتریمی (عفونت خون) در افراد سالخورده‌است. زایمان زودرس و پارگی زودهنگام غشا در هنگام بارداری، خطر انتقال باکتری به نوزاد را افزایش می‌دهد. زنان بارداری (زنان باردار بین هفته ۳۵ ام تا ۳۷ ام از بارداری) که توسط باکتری کلونیزه شده‌اند باید بطور پیشگیرانه تحت درمان با آنتی بیوتیک‌ها قرار گیرند تا خطر انتقال باکتری به نوزاد کاهش پیدا کند.

خصوصیات آزمایشگاهی GBS: همولیز β، مقاوم به باسیتراسین و کوتریموکسازول، حساس به ونکومایسین، هیپورات سدیم مثبت، CAMP مثبت می باشد.

### ✓ تست هیدرولیز هیپورات

چندین گونه باکتری از جمله استرپتوکوک گروه B، قادر به هیدرولیز هیپورات هستند. وجود آنزیم هیپوریکاز (hyppuricase) بوسیله دیدن رنگ محصول نهائی تشکیل شده وقتی که نین هیدرین آمینواسیدهائی را که در طی هیدرولیز هیپورات تولید شده‌اند را اکسید می‌کند، مشخص می‌شود.

اصول: محصولات نهائی هیدرولیز اسید هیپوریک، گلیسین و اسید بنزوئیک می‌باشد. گلیسین با استفاده از معرف اکسید کننده نین هیدرین دآمینه می‌شود. محصول نهائی حاصل از اکسیداسیون نین هیدرین تشکیل یک رنگ ارغوانی را می‌دهد. محیط مورد استفاده باید فقط حاوی هیپورات باشد، چون نین هیدرین ممکن است با هر اسید آمینه موجود در محیط کشت یا سایر محیط‌های براث واکنش نشان دهد.

روش انجام آزمایش: باکتری را در یک محیط براث + یک درصد هیپورات سدیم تلقیح می کنیم. لوله‌ها را به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه نمائید. اگر توانست هیپورات سدیم را تجزیه کند آن را به گلایسین و بنزوئیک اسید تبدیل می کند. پس از انکوباسیون به آن ۰,۲ میلی لیتر از معرف نین هیدرین را به لوله اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر لوله را انکوبه نمائید.

در اثر هیدرولیز هیپورات رنگ قهوه ای تیره در لوله مشاهده می‌شود. این آزمایش را می‌توان جهت شناسائی سایر ارگانیسم‌ها از جمله لیستریا نیز به کار برد.

### ✓ تست CAMP

استرپتوکوک گروه B یک ماده شبه پروتئینی به نام فاکتور CAMP تولید میکند که با بتا توکسین ایجاد شده توسط برخی از سویه ای استافیلوکوکوس اورئوس حالت سینرژیسم داشته و همولیز قوی ایجاد می کند.

روش کار:

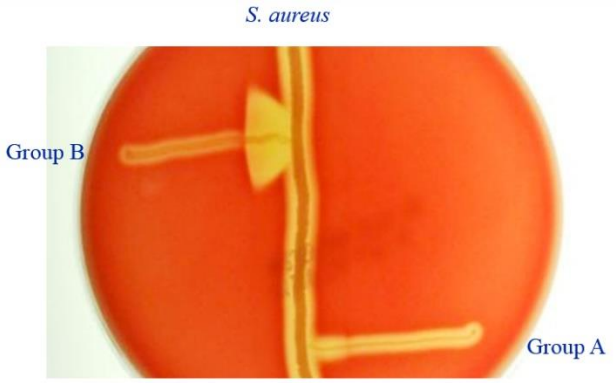
۱.در وسط پلیت بلاد آگار یک سوش همولیتیک *S. aureus* را به صورت یک خط مستقیم کشت دهید.

۲.باکتری مشکوک به استرپتوکوک گروه B را به صورت عمود بر خط کشت استافیلوکک کشت دهید. البته بین دو خط کشت فاصله باید باشد وبا هم تلاقی نکنند.

۳.پلیت را به مدت یک شب در ۳۵-۳۷ و یا به مدت شش ساعت در جار شمع دار در همان حرارت قرار دهید. قرار دادن در محیط بدون $CO_2$ اختصاصی بودن تست را افزایش میدهد.

۴.در صورتی که باکتری مورد آزمایش استرپتوکک گروه B باشد در مجاورت خط کشت استافیلوکک همولیز تشدید می شود و به شکل سر پیکان مشاهده می شود.

حدود ۹۵ درصد استرپتوکک های گروه B و سوش های نادری از گروههای دیگر دارای تست کمپ مثبت هستند.



## استرپتوکوکوس نومونیه *S. pneumoniae*

استرپتوکوک نومونیه یا نوموکوک (pneumococcus) به صورت دیپلوکوک های شعله شمعی یا نیزه ای می باشد که کوکسی گرم مثبت کاتالاز منفی و کپسول دار هستند. نوموکوک فاقد پیلی و حرکت می باشد. نوموکوک یکی از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زا در انسان است. این باکتری عامل اصلی بیماری نومونی (ذات الریه) می‌باشد. این باکتری می‌تواند عفونت‌های دیگری مانند سینوزیت، اوتیت (عفونت گوش میانی)، باکتریمی، سپسیس، مننژیت، استئومیلیت، آرتریت سپتیک، اندوکاردیت، پریتونیت، پریکاردیت، سلولیت و آبسه‌های مغزی را نیز ایجاد کند. در حال حاضر نوموکوک شایع ترین عامل مننژیت و اوتیت میانی در کودکان در سراسر دنیا می‌باشد. پلی‌ساکارید کپسولی، از لحاظ ایمونولوژیک در بیش از ۹۰ نوع نوموکوک، مشخص و متمایز است. تیپ ۳ نوموکوک بیماری‌زا ترین سروتیپ نوموکوک بوده که بیشترین میزان ماده کپسولی را نیز تولید می‌کند. کپسول نوموکوکی ایمونوژن بوده و علیه آن آنتی بادی حفاظتی تولید می‌شود. اترپتوکوک نومونیه جداشده از این بیمار را می‌توان با استفاده از آنتی‌سرم‌های تولیدی علیه کپسول پلی‌ساکارید ارگانیسم تعیین سروتیپ نمود. برای این منظور یک قطره از سوسپانسیون میکروبی را با یک قطره آنتی‌سرم اختصاصی و نیز یک قطره رنگ متیلن‌بلو (بعنوان رنگ زمینه) مخلوط می‌کنند. وقتی آنتی‌سرم با کپسول باکتری واکنش داد کپسول اطراف دیپلوکوک‌ها بصورت متورم می‌شود. این واکنش را تورم کپسولی یا تورم کوآلانگ می‌نامند. (Quellung در زبان آلمانی همان تورم"Swelling"معنا می‌دهد.)

نوموکوک در شرایط هوازی دارای همولیز ∝ (آلفا) (به دلیل تولید $H_2O_2$) و در شرایط بی هوازی دارای همولیز بتا (به دلیل تولید یک همولیزین به نام نومولایزین که در شرایط بی‌هوازی فعال می‌شود) می باشد. این دسته از باکتری ها حساس به ونکومایسین بوده و در محیط حاوی گلوکز زیاد پس از مدتی رشد سریع شروع به از بین رفتن می‌کند؛ زیرا با تولید اسیدلاکتیک و اسیدی شدن محیط ارگانیسم از بین می رود. شکل کلنی باکتری بر روی محیط بلاد آگار به صورت شیرینی دونات (doughnut-shaped) است. نوموکوک بسیار حساس به شرایط محیطی می باشد و سریعا اتولیز می شود. به گونه ای که حتی در حضور H2O2 تولیدی خود سریعا از بین می رود. پنوموکوک از جمله باکتری های کاپنوفیل بوده و برای رشد نیازمند CO 2 است. رشد نوموکوک در اطراف دیسک

اپتوچین مهار می شود، تست انحلال در صفرای آن مثبت است؛ یعنی نوموکوک در صفرا حل شده و در محیط حاوی صفرا سریعا لیز می گردد.

### ✓ تست حساسیت به اپتوچین

نوموکوک به اپتوچیت (ترکیب اتیل هیدروکوپرئین هیدروکلراید) حساس بوده و از این تست برای افتراق نوموکوک از سایر اعضای استرپتوکوک آلفا همولیز مخصوصا گروه ویریدانس استفاده می‌شود که این باکتری به ان حساس بوده اما سایر اعضای این خانواده مقاومند.روش انجام آزمایش: تست مثل یک انتی بیوکرام معمولی برروی بلاد اگار انجام می گیرد. ابتدا محیط کشت را شماره گذاری نماید سپس توسط لوپ استریل یا سواب استریل نمونه برداری نموده و به صورت کامل و یکنواخت کشت نمایید آنگاه توسط پنس استریل از دیسک اپتوچین برداشته و دیسک مورد نظر را در وسط محیط کشت قرار دهید و محیط کشت را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس حاوی ۵٪ $CO_2$ ویا درون جار شمع دار انکوبه نمایید. در صورت مشاهده هاله عدم رشد باکتری مر بوطه حساس بوده و استرپتوکوک نومونیه می باشد.

### ✓ تست انحلال در صفرا

نوموکوک آنزیم اتولیتیک تولید می‌کند که در طی رشد باکتری قادر به لیزکردن دیواره سلولی خود ارگانیسم می‌باشد. وقتی‌که در مجاورت یک نمک صفراوی مانند سدیم‌داکسی‌کولات قرارمی‌گیرد این جریان طبیعی تسریع می‌شود.

روش انجام آزمایش: برای انجام این تست دو لوله حاوی یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل را آماده می‌کنیم. سپس درون لوله‌ها، چند کلنی از باکتری حل می‌کنیم. بر روی یکی از لوله‌ها مقدار نیم میلی‌لیتر محلول سدیم دزوکسی کلات ٪۲ و درون لوله دیگر نیم میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی میریزیم. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس لوله‌ها را مشاهده میکنیم. در صورتی که باکتری مورد نظر نوموکوک باشد لوله حاوی سدیم دزوکسی کلات باید کاملا شفاف شده باشد و به عبارتی باکتری‌ها لیز شده باشند. لوله دوم که فاقد سدیم دزوکسی کلات هست به عنوان کنترل منفی بوده و باید محلول آن کدر باقی بماند. روش دیگر اینگونه است که یک قطره سدیم‌داکسی‌کولات ۱۰٪ روی یک کلنی $\alpha$- همولیتیک منفرد روی محیط آگار خوندار ریخته می‌شود و محیط بمدت

۳۰ دقیقه بحال خود رها شده و سپس بررسی می‌شود. در اینجا کلنی اگر باکتری نوموکوک باشد حل شده یا پخش می‌شود. استرپتوکوک‌های آلفاهمولیز دیگر قابلیت انحلال در صفرا را ندارند و تغییری در کلنی آنها بوجود نمی‌آید.

## انتروکوک‌ها (Enterococci)

انتروکوک ها سابقاً در جنس استرپتوکوک‌ها بودند و در گروه استرپتوکوک های گروه D قرار می‌گرفتند، ولی بعداً از آن‌ها جدا شده و در جنس مجزای انتروکوک قرار گرفتند. این باکتری‌ها فلور طبیعی روده ی بزرگ بوده و در عفونتهای بیمارستانی مطرح است.کوکسی های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری و کاتالار منفی می باشد. ساختار کلی آنتی ژنتیک این باکتری مشابه سایر باکتری های گرم مثبت بوده است. انتروکوک ها قادر به تحمل ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ دقیقه و pH6/9 را دارند. دو گونه مهم همزیست از انتروکوک در روده انسان (مدفوع) عبارتند از: انتروکوک فکالیس *Enterococcus faecalis* (٪۹۰ تا ٪۹۵) و انتروکوک فاسیوم *Enterococcus faecium* (٪۵ تا ٪۱۰). سایر گونه‌های انتروکوک که به ندرت ایجاد بیماری می‌کنند عبارتند از انتروکوک کاسلی فلاووس، انتروکوک گالیناروم و انتروکوک رافینوسوس. مهمترین عفونت‌های ایجاد شده توسط انتروکوک‌ها عبارتند از: عفونت‌های مجرای ادراری، باکتریمی، اندوکاردیت و مننژیت. سویه‌های حساس را می‌توان با استفاده از آمپی سیلین و وانکومایسین درمان کرد. انتروکوک‌ها از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی هستند. مقاومت به آنتی بیوتیک ونکومایسین در برخی سویه‌های انتروکوک ها، مصرف این دارو را محدود کرده است.

این باکتری‌ها بر خلاف استرپتوکوک‌ها نیازهای غذایی پیچیده‌ای برای رشد نداشته و به راحتی در محیط‌های ساده و فاقد خون و مواد مغذی خاص رشد می‌کنند. خصوصیات مهم آزمایشگاهی انتروکوک عبارتند از: رشد در محیط بایل اسکولین و تولید کلنی‌های سیاه رنگ (توانایی رشد در محیط حاوی صفرا را دارند وهیدولیزکننده ی اسکولین هستند)، تست PYR آنها مثبت بوده، توانایی رشد در دمای ۴۵ $^{\circ}$ سلسیوس را دارند، توانایی رشد برروی محیط های ساده و محیط های انتخابی گرم منفی ها مانند مک کانکی وEMB را دارند.

### ✓ تست رشد در محیط بایل اسکولین

بایل اسکولین آگار جهت افتراق استرپتوکوک های گروه D (انتروکوک‌ها) از استرپتوکوک های دیگر به کار می رود.

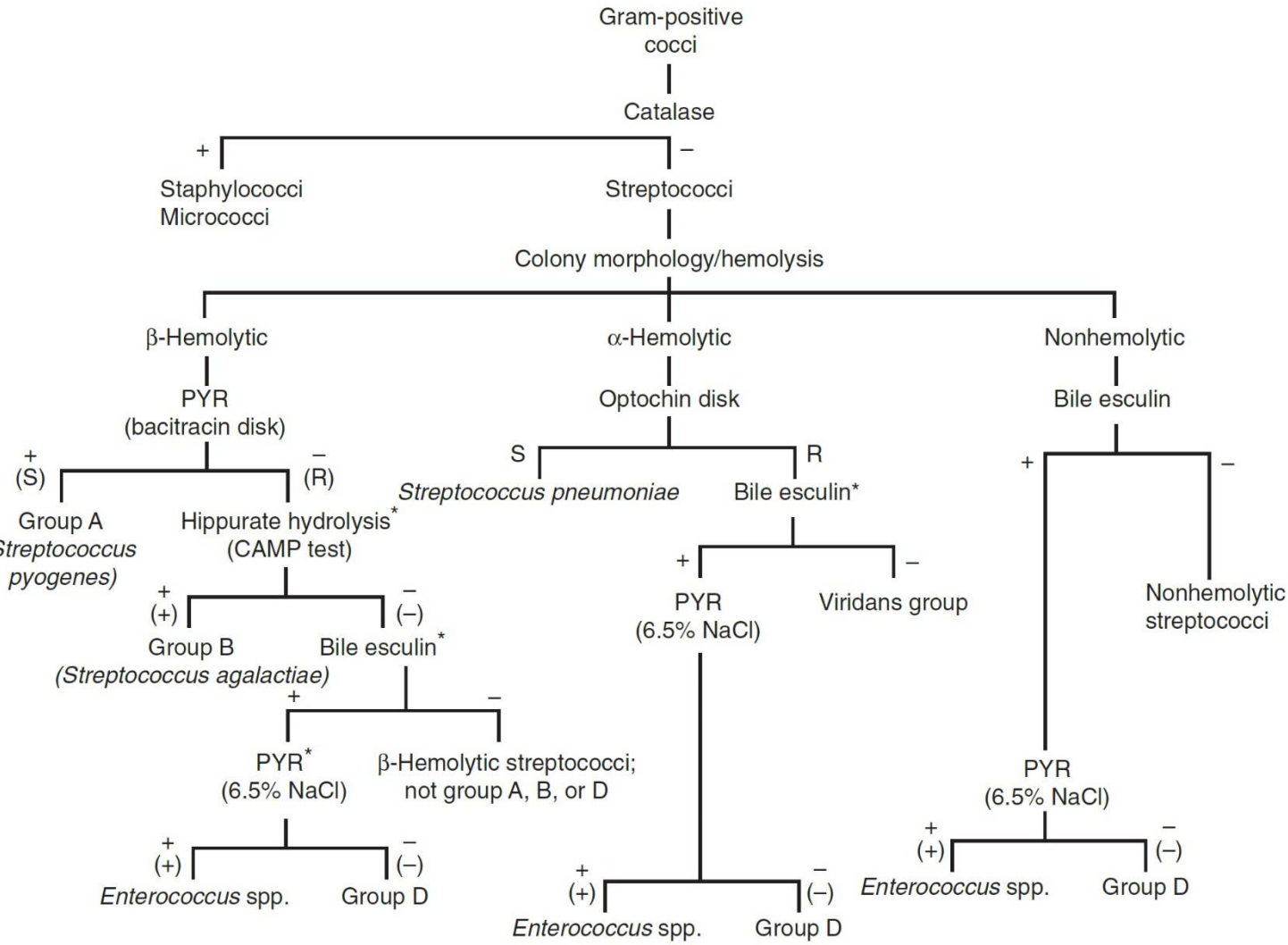
اصول کار: استرپتوکوک های گروه D (شامل انتروکوک ها) گلیکوزید اسکولین را به اسکولتین و دکستروز تجزیه می کنند. اسکولتین (Esculetin) با نمک آهن به شکل کمپلکس قهوه ای تیره یا سیاه واکنش می دهد. سیترات فریک به عنوان معرف (اندیکاتور) تجزیه اسکولین و تشکیل اسکولتین، به داخل محیط افزوده می شود. وجود Oxgall (صفرای گاوی) نیز در این محیط رشد باکتری های گرم مثبت به جز انتروکوک ها را مهار کند. پس این محیط یک محیط انتخابی-افتراقی می‌باشد.

روش انجام کار: محیط کشت بایل اسکولین را با دو یا سه کلنی تلقیح کنید (اگر محیط کشت در لوله تهیه شده، باید سطح و عمق را تلقیح نمایید) و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، در شرایط هوازی یا اتمسفر محتوی دی اکسید کربن، انکوبه نمایید (بعضی از سویه ها به انکوباسیون بیشتری، نهایتاً ۴۸ ساعت، نیاز دارند). سیاه شدن محیط و کلنی‌ها دلالت بر مثبت بودن نتیجه آزمایش دارد. نتیجه مثبت اغلب در طی ۴ ساعت ظاهر می شود. اما در نهایت همه استرپتوکوک های گروه D در طی ۴۸ ساعت، مثبت خواهند شد.

## خصوصیات بیوشیمیایی استرپتوکوک‌ها

| گونه های استرپتوکوکوس | باسیتراسین | اپتوچین | PYR | هیدرولیز هیپورات | CAMP | حلالیت در صفرا | رشد در محیط بایل اسکولین | رشد در محیط ۶,۵٪ نمک |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **استرپتوکوکوس پایوژنز** *S. pyogenes* | حساس | مقاوم | + | – | – | – | – | – |
| **استرپتوکوکوس آگالاکتیه** *S. agalactiae* | مقاوم | مقاوم | - | + | + | – | – | – |
| **استرپتوکوکوس نومونیه** *S. pneumoniae* | مقاوم | حساس | - | – | – | + | – | – |
| **استرپتوکوک گروه ویریدنس** Viridans group | مقاوم | مقاوم | - | – | – | – | – | – |
| **انتروکوکوس** *Enterococcus spp.* | مقاوم | مقاوم | + | - | – | – | + | + |

**مراحل شناسایی استرپتوکوک‌ها**



## جلسه سوم: کوکسی‌های گرم منفی (خانواده نایسریاسه)

این خانواده شامل جنس‌های نایسریا ، ایکنلا، کینگلا و سیمونسیلا می باشد . همگی گرم منفی اند.

جنس نایسریا دو گونه بیماریزای مهم دارد که عبارتست از:

نایسریا گونوره‌آ یا گنوکوک *N. gonorrhoeae*can (gonococcus) عامل بیماری سوزاک و آرتریت چرکی

نایسریا منتژیتیدیس یا منگوکوک *N. meningitides* (meningococcus) عامل بیماری منتژیت و سپتمی سمی منگوکوکی

### ***N. gonorrhoeaecan*** **(gonococcus)**

این باکتری معمولا به صورت دیپلوکوک گرم منفی به شکل لوبیا در زیر میکروسکوپ دیده می شود که در برداشت مستقیم از ترشح مجرا ویا واژن ودر داخل لوکوسیت‌ها نیز دیده می شود .

برای رشد به محیط های غنی شده باخون همچون چاکلت آگار نیاز می‌باشد. محیط بسیار مناسب جهت رشد گونوکوک محیط New York City Medium می باشد. که به نام پروتئوز پپتون کورن استارچ آگار هم خوانده می شود. ترکیبات آن شامل: پلاسمای اسب ، هموگلوبین ، گلوکز ، عصاره مخمر بـه همراه چ‌هار آنتی بیوتیک پلی میکسینB، کانامایسین، ونکومایسین ونیستاتین که مانع رشد سایر میکروارگانیسم ها از قبیل کاندیدا آلبیکنس می شوند . به منظور رشد ، این باکتری باید در مجاورت ۵ الی ۱۰ درصد $CO_2$ قرار گیرد.

### ***N. meningitides*** **(meningococcus)**

در اسمیر رنگ شده خیلی شبیه گونوکوک بوده و به صورت دوتایی یا چهارتایی در درون لوکوسیت ها یا آزاد دیده می شود. روی بلاد آگار کلنی آن مرطوب ، برآمده ، صاف ، به رنگ خاکستری متمایل به آبی می باشد.گلوکز ومالتوز را تخمیر می کند و اکسید

کردن مالتوز صفت متمایز آن از گونوکوک محسوب می شود . بر اساس واکنش‌های سرولوژیکی پلی ساکاریدهای کپسول تشخیص داده می شود.سروگروپ‌های جدا شده با آگلوتیناسیون یا تورم کپسول با آنتی سرم های اختصاصی تشخیص داده می شود.

**Thayer Martin Agar**

محیط دیگری که برای جداسازی نایسریا گونوره‌آ ونایسریا منتژیتیدیس به کار می رود. .این محیط را می توان با افزودن سه آنتی بیوتیک ونکومایسین ، کلیستین و تری متوپریم به محیط چاکلت آگار تهیه کرد.

**Cystine tryptic agar (CTA)**

یکی دیگر از روش های تشخیص وتایید گونوکوک ار بردن محیطهای مختلف کربوهیدرات است. برای این کار از محیط CTA استفاده می شود که به آن ۱٪ گلوکز ، مالتوز ، ساکارز ، فروکتوز و یا لاکتوز اضافه نموده بعد از استریل نمودن وآماده کرده به حالت stab یک آنس پر از کشت تازه باکتری را در عمق وسطح محیط کشت می دهیم وآنرا در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۰ درصد $CO_2$ انکوبه میکنیم.

| | گلوکز | مالتوز | فروکتوز | ساکارز | لاکتوز |
|---|---|---|---|---|---|
| **نایسریا گونوره آ** | + | – | – | – | – |
| **نایسریا منتژیتیدیس** | + | + | – | – | – |
| **نایسریا لاکتامیکا** | + | + | – | – | + |

## جلسه چهارم: کورینه باکتریوم ها و لیستریا ها

کورینه باکتریوم ها شامل دو گروه بیماری زا و غیر بیماری زا هستند.گروه غیر بیماری زا را تحت عنوان دیفتروئیدها میشناسیم که به صورت فلور نرمال در بینی،گلو،دستگاه تنفسی و ... وجود دارند.

مهمترین گونه که گونه ی بیماری زاست، کورینه باکتریوم دیفتیریه میباشد.کورینه باکتریوم دیفتریه از نظر مورفولوژی یا شکل، باسیل گرم مثبت است.باسیل های گرم مثبت شامل دو گروه هستند،باسیل های تولید کننده ی

اسپور و باسیل هایی که قادر به تولید اسپور نیستند.دسته ای که قادر به تولید اسپورهستند شامل باسیلوس ها و کلستردیوم ها میباشد.باسیلوس ها هوازی و کلستردیوم ها بی هوازی اند.باسیل های بدون اسپور شامل کورینه باکتریوم ها و لیستریا هستند.

همانطور که گفته شد این دسته از باکتری ها باسیل گرم مثبت،فاقد اسپور و کپسول و حرکت هستند.آرایش آن ها به صورت دوتایی یا تکی و زنجیره ای نیست بلکه آرایش حروف چینی دارند.به طور مثال X شکل، Vشکل و...

از نظر نیاز به اکسیژن هوازی،بی هوازی اختیاری هستند ولی در شرایط هوازی رشد بهتری دارند.معمولا اضافه کردن ترکیباتی مانند سرم و خون در محیط کشت آن ها به رشد بهترشان کمک میکند.

کورینه باکتریوم دیفتیریه عامل عفونت جلدی است که بینی و گلو را در برمیگیرد و علائم بالینی غیر اختصاصی مانند تب،گلودرد و لرز را سبب میشود .اما علامت اختصاصی آن پرده ی خاکستری است که در انتهای گلو ایجاد میکند که موسوم به پرده ی غشای کاذب است و جهت تشخیص میتوان از آن استفاده نمود.

کورینه باکتریوم دیفتریه،بر خلاف استاقیلوکوک اورئوس،باکتری تهاجمی نیست. زیرا تنها virulence factor آن اگزوتوکسین است و قابلیت بیماری زایی بالای آن به دلیل ویرولانس فاکتور قوی اش است و نه قابلیت تهاجم بالا.عفونت در ابتدا موضعی است ولی در صورت عدم درمان میتواند منتشر شود و روی سیستم عصبی،قلب،اندام های داخلی و ... اثر بگذارد و باعث مرگ شود.هم اکنون میزان مرگ ناشی از این باکتری کمتر از گذشته است به دلیل مصونیت با واکسن های سه گانه.(کزاز،دیفتری،سیاه سرفه(

کورینه باکتریوم دیفتریه هایی قادر به تولید توکسین هستند که توسط باکتریوفاژ آلوده شده باشند.باکتریوفاژها دو نوع چرخه دارند.چرخه ی لیتیک و لیزوژنیک.طی چرخه ی لیتیک وارد باکتری شده و باعث مرگ باکتری

میشوندو در چرخه ی لیزوژنیک ژنوم خود را داخل ژنوم باکتری تلقیح میکنند.ژن تولید کننده ی توکسین در کورینه باکتریوم دیفتریه به همین واسطه وارد ژنوم آن شده است.

این باکتری ۳ بیوتیپ مهم دارد.اینترمدیوس،گراویس و میتیس که شایع ترین آن اینترمدیوس است.

محیط های اختصاصی آن ها محیط های لوفلر و محیط های بر پایه ی تلوریت است.زیرا این قابلیت را دارند که تلوریت را احیا کنند و در این محیط ها معمولا رنگ کلونی خاکستری با مرکز سیاه است.

محیط های بر پایه ی تلوریت مانند تلوریت پتاسیم،تلوریت سیستئین آگار و ... که محیط های غنی هستند زیرا نمونه ای که در آن به دنبال این باکتری ها میگردیم مقدار کمی دارد و جداسازی باکتری از آن دشوار است مانند csf،نمونه گلو و ... که rate جداسازی آن پایین است و برای بالا بردن rate جداسازی باید از محیط های غنی استفاده کنیم.

تست های انجام پذیر برای این دسته از باکتری ها:

رنگ آمیزی گرم : باسیل های گرم مثبت دارای آرایش حروف چینی میبینیم.

رنگ آمیزی آلبرت :همانطور که میدانیم در محتوی سیتوپلاسمی میکروب ها ترکیبات و گرانول های ذخیره ای به نام انکلوژن بادی وجود دارد.که دارای ماهیت های مختلفی هستند.برخی از جنس قند،برخی از جنس چربی،فسفات و گوگردند.هدف این گرانول ها اغلب تامین انرژی است.برخی از این گرانول ها عمومیت دارند مانند گرانول های قندی که در بسیاری از میکروارگانیسم ها قابل مشاهده هستند.اما برخی از گرانول ها فقط مختص به یک جنس و یا گونه ی خاص میباشند.از جمله این گرانول ها، دانه های متاکروماتیک یا ولوتین و یا باب ارنست است.جنس آن ها

فسفات است و باکتری میتواند از آن برای تامین انرژی و تولید ATP و ...استفاده کند.این نوع از گرانول ها مختص کورینه باکتریوم دیفتریه است،بنابراین شناسایی آن دارای ارزش تشخیصی میباشد.

رنگ آمیزی آلبرت،رنگ آمیزی اختصاصی این گرانول هاست که نوعی رنگ آمیزی افتراقی میباشد.در رنگ آمیزی افتراقی از بیش از یک رنگ استفاده میشود.

نحوه ی انجام رنگ آمیزی:پس از تهیه ی اسمیر ،خشک و فیکس کردن آن رنگی به نام رنگ آلبرت I را اضافه میکنیم که حاوی دو رنگ تلوئیدن بلو و مالاشیت گرین است.۷-۵ دقیقه به آن زمان میدهیم سپس رنگ اضافه را خارج میکنیم.ترکیب بعدی لوگول آلبرت(به عنوان تثبیت کننده) را اضافه کرده و بعد از ۲ دقیقه رنگ را شستشو میدهیم و لام را زیر میکروسکوپ میبینیم.

زیر میکروسکوپ دانه های به رنگ آبی تیره یا سیاه رنگ که رنگ تلوئیدن بلو را به خود گرفته اند،را در زمینه ای سبز رنگ میبینیم.صرفا با رنگ آمیزی آلبرت نمیتوان گزارش را مثبت اعلام کرد.

## تشخیص بر پایه ی صفات بیوشیمیایی:

کورینه باکتریوم ها میتوانند از گلوکز و مالتوز به عنوان منبع کربن استفاده کنند.اما قابلیت تخمیر ساکاروز،مانیتول و ترهالوز را ندارند.این خاصیت بیوشیمیایی تمامی کورینه باکتریوم هاست پس به ما اجازه ی تمایز پاتوژن و غیر پاتوژن را نمیدهد.

بنابراین اگر در محیط ما قند گلوکز یا مالتوز وجود داشته باشد در حضور فنل رد، در صورت تخمیر قند به دلیل ایجاد محصولات اسیدی رنگ محیط زرد میشود

به طور کلی: این باکتری ها قابلیت هضم ژلاتین را ندارند(ژلاتین منفی)،اکسیداز منفی ،کاتالاز مثبت و هیدرولیز نشاسته فقط در بیوتیپ گراویس مثبت است(به واسطه ی آنزیم آمیلاز)پس میتواند باعث تمایز گراویس از دو بیوتیپ دیگر شود.

با توجه به اینکه نشاسته در حضور ید بنفش میشود،وقتی باکتری را کشت داده و در انکوباتور بگذاریم و بعد از ۲۴ ساعت بیرون آورده و به آن ید اضافه کنیم،در صورتی که بنفش رنگ شود هیدرولیز نشاسته منفی است.(نشاسته وجود داشته و با ید وارد واکنش شده است) و در صورتی که هاله شفاف تشکیل شود،هیدرولیز نشاسته مثبت است.

تست اوره آز: باعث تمایز گونه ی پاتوژن از غیر پاتوژن میشود.گونه ی بیماری زا اوره آز منفی و غیر بیماری زا اوره آز مثبت اند.

در محیط اوره وجود دارد.اگر باکتری اوره آز داشته باشد،اوره را تبدیل به آمونیاک کرده و از آن به عنوان منبع نیتروژن استفاده میکند.بنابراین PH محیط قلیایی شده و صورتی یا قرمز رنگ میشود(معرّف فنول رد ).پس اگر محیط قرمز شد، اوره مثبت است.و اگر تغییر رنگ نداد اوره منفی است.

تست شیک :برای ارزیابی مصونیت کاربرد دارد.مقداری توکسین مشخص را به صورت داخل جلدی تزریق میکنیم.اگر پس از ۴۸-۲۴ ساعت هیچ التهاب و اریتمی ایجاد نشود،تست شیک منفی است و فرد مصون است.اگر التهاب یا اریتم ایجاد شود،تست شیک مثبت است و فرد مصون نیست.

تست الک:

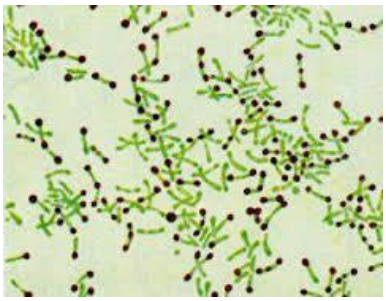
در این تست باکتری مجهول را همراه کنترل مثبت در محیط به صورت موازی کشت میدهند.در قسمت مرکزی پلیت کاغذی وجود دارد که آغشته به آنتی توکسین است.

اگر باکتری از نوع بیماری زا باشد همزمان با رشدش تولید اگزوتوکسین میکند و با آنتی توکسین موجود وارد واکنش شده و رسوب ۴۵ درجه ایجاد میکند.از نمونه مثبت جهت مقایسه استفاده میکنیم.

روش های مولکولی بر پایه ی :PCR ژن tox تولیدکننده ی توکسین است.برای این ژن پرایمر طراحی میکنند،اگر جایگاه اتصال داشته باشد میچسبد و باند میبینیم،در نتیجه نمونه مثبت است.یعنی این ژنوم ژن تولید توکسین را دارد و بیماری زا است.

باسیل لفلر، گرم مثبت، به طول 5 میکرومترو اغلب پلئومرفیسم دارند .باکتری گاهی مستقیم و زمانی دارای انحنای مختصری است .معمولاً یک یا دو انتهای آن بزرگتر و به شکل گرز بنظر می رسد .به این جهت آنها را کرینه باکتریوم می نامند.

طرز قرارگرفتن این باسیل اکثراً متقاطع بوده که آن را به حروف چینی با الفبای لاتین تشبیه می کنند .در رنگ آمیزی اختصاصی آلبرت یا نیسر اغلب در یک یا دو قطب آن دانه های متاکروماتیک مشاهده می شود . بطوریکه در روش آلبرت ، باسیلها به رنگ سبز و(Methachromatic granules) دانه های متاکورماتیک به رنگ آبی مایل به سیاه و در رنگ آمیزی نیسر باسیلها به رنگ قهوه ای روشن و دانه های متاکورماتیک به رنگ آبی مایل به سیاه دیده می شوند.



دانه های متاکروماتیک بهد از رنگ امیزی البرت

## خصوصیات محیط های کشت باسیل لفلر

۱محیطی است غنی شده که اکثر باکتریها برروی آن رشد می کنند ولی بعنوان محیط اختصاصی کورینه باکتریوم دیفتریه بکار می رود. در روی این محیط پرگنه ها پس از ۸-۱۸ ساعت ظاهر می شود

2-دانه های متاکروماتیک در گسترشی که از این محیط تهیه شده باشد بخوبی نمایان است.

3-پرگنه سه تیپ باسیل لفلر را در این محیط نمی توان از یکدیگر تشخیص داد . پرگنه ها ابتدا مدور کوچک، سفید یا حاشیه منظم می باشد .به تدریج مرکز پرگنه ضخیم و محیط آن دندانه دار می گردد.

4-بعضی از انواع گراویس روی این محیط رشد نمی کنند.

**ب -محیط تلوریت پتاسیم**

.این محیط برای جداسازی و تشخیص انواع سه گانه باسیل لفلر به کار می رود و دارای خصوصیات زیراست:

1-تلوریت پتاسیم موجود در این محیط از رشد بیشتر باکتریهای فلورنرمال مجاری فوقانی دستگاه تنفس مانند باکتریهای گرم منفی ، انواع استافیلوکوک و استرپتوکوک ممانعت به عمل می آورد.

2-پرگنه های انواع سه گانه دیفتری روی این محیط به خوبی از یکدیگر قابل تشخیص است.

کلنی گراویس بزرگ ، مسطح ، خاکستری تا سیاه با ظاهری کدر به بزرگی 3 تا 5 میلی متر شبیه به گل مینا بوده و پرگنه انترمدیوس بسیار کوچک و به بزرگی 1 میلی متر شبیه به تخم قورباغه و پرگنه میتیس سیاه، براق ، محدب به بزرگی 2 تا 4 میلی متر و شبیه به تخم مرغ نیمرو شده است.

۳-(تلوریت پتاسیم $K_2TeO$) پرگنه باسیل لفلر ، دیفتری مرف و بعضی انواع استافیلوکوک ، موجود در محیط را که بیرنگ است ، احیا نموده و به تلوریم سیاه رنگ تبدیل می نمایند. به همین دلیل در محیط، پرگنه ها سیاه رنگ دیده می شوند.

4-شکل باسیل لفلر در گسترش کاملاً تی پیک نیست و دانه های متاکروماتیک کمترمشاهده می گردد.

5-پرگنه باسیل لفلرروی محیط پس از 24 تا 48 ساعت ظاهر می شود.

6-برخی از انواع می تیس روی آن رشد نمی نمایند.

**ج محیط تینسدال (Tinsdale)**

تینسدال محیطی مناسب برای تشخیص افتراقی کرینه باکتریوم دیفتریه از دیفتری مرف) به استثنای ک .اولسرانس و ک . پسودو توبرکولوزیس ( و همچنین جداسازی باسیل لفلر در یک نمونهٔ مخلوط است.

محیط تینسدال حاوی پروتئین ، کلرور سدیم، ال سیستین و تیوسولفات سدیم، تلوریت و آگاراست .انتخابی بودن این محیط برای باسیل لفلر ، به دلیل غلظت بالای تلوریت است .احیای تلوریت به تلوریم موجب سیاهی رنگ کلنی ها می گردد .در اطراف کلنی های سیاه باسیل لفلر و کورینه باکتریوم اولسرانس و کرینه باکتریوم پسودوتوبرکولوزیس هاله قهوه ای رنگی دیده می شود که به تشکیل فریک سولفید Cysteine sulfhydrolase علت فعالیت آنزیم سیستئین سولفوهیدرولازاست .در روی این محیط باسیلهای کرینه باکتریوم دیفتریه ، کری نه باکتریوم اولسرانس و کرینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس پرگنه های صاف، خاکستری ، سیاه برجسته با هاله ای سیاه مایل به قهوه ای تشکیل می دهند . در حالیکه دیفتری مرف های دیگر هاله ای ایجاد نمی کنند.

**د – محیط (Cystine Trypticase agar)**

**رنگ آمیزی آلبرت (Albert staining)**

1-گسترش تهیه شده را با حرارت ثابت کنید.

2-گسترش را مدت 6 دقیقه تحت تأثیر محلول آلبرت قرار دهید.

3-با پوارلام را از مرکز گسترش خشک کنید.

4-لام را مدت 3 الی 4 دقیقه تحت تأثیر محلول لوگل قرار دهید.

در این روش پروتوپلاسم باکتری به u1585 رنگ سبز و دانه های کروماتیک به رنگ آبی مایل به سیاه مشاهده می گردند.

## لیستریا

لیستریا منوسیتوژنز عامل بیماری لیستریوز است که از بیماری های مشترک وحیوان می باشد. در بزرگسالان غیر باردار، مننژیت اولیه، انسفالیت ، یا سپتی سمی ایجاد می کند . بیماران مسن تر یا افرادی که مستعد هستند و ایمنی سلولی آن ها پایین است، مانند گیرندگان پیوند اعضاء، مبتلایان به لنفوم و ایدز افرادی هستند که مشخصاً مستعد بیماری هستند . تمایل لیستریا مونوسیتوژنز به سیستم عصبی مرکزی منجر به بیماری حاد می شود که معمولاً میزان کشندگی آن بالاست بنحوی که در موارد اپیدمیک عفونت مواد غذایی میزان مرگ و میر ۴۰-۳۰ درصد و در افراد مستعد تا ۷۵ درصد هم گزارش شده است و در بین افرادی که از بیماری بهبود یافته اند، علایم نورولوژیک باقی می گذارد . بارداری خطر ابتلا به لیستریوز را افزایش می دهد . لیستریا مونوسیتوژنز در زنان باردار معمولاً باعث بیماری باکتریمی مشابه آنفولانزا می شود که اگر درمان نشود، می تواند به التهاب جفت و یا پرده آمنیوتیک و عفونت جنین و در نهایت سقط، به دنیا آمدن نوزاد مرده و یا تولد زودهنگام منجر شود، چرا که این باکتری قادر به عبور از جفت است .در عفونت لیستریوزیس در زنان باردار معمولا هیچ علامت مشخصی وجود ندارد یا فقط سابقه‌ای از بیماری شبه آنفولانزا و خود محدود شونده در مدت سه ماهه آخر بارداری وجود دارد. اما علایمی همچون تیره شدن مایع آمنیوتیک، دردکمر، تب و لرز، زایمان زودرس و التهاب کلیه و لگن می‌تواند از نشانه‌های لیستریازیس باشد. بیش از ۹۵ درصد موراد جدا شده از موراد تک گیر و همه گیر لیستریوز انسانی به سروتیپ های ۱,۲ a، 1.2b، 1.2c و ۴ bاختصاص دارد

دو نوع منوسیتوژنز وایوانوی بری انسان بیماریزا می باشد لیستریوز بیماری مشترک انسان وحیوان است که عامل آن لیستریا منو سیتوژنز می باشد . علت نامگذاری این باکتری ازدیاد تعدادمونوسیتها درحیوانات الوده آزمایشگاهی بوده است . لیستریا باسیلهای گرم مثبت کوتاه (مستقیم یا کمی خمیده) بدون کپسول بدون اسپور کاتالاز مثبت واکسیداز مثبت هستند

کشت : دربسیاری ازمحیطهای کشت مانند مولرهینتون آگار وآگارخوندار به خوبی رشد می کند . قادر به ایجادهمولیز بتادرآگارخوندار است لذاممکن است بااستربتوکوکهای بتا همولیتیک اشتباه گردد .لیستریا منوسیتوژنز قادر به رشددردمای Cold enrichment 4درجه سانتیگراد است لذا می توان روش انجام داد یعنی نمونه هابه مدت چندروزدردمای ۴ درجه سانتیگراد قرارداده وسپس اقدام به کشت نمود.
تست آنتون : ۲تا۳ قطره ازمحیط کشت مایع لیستریا رادر ملتحمه چشم خرگوش تلقیح کرده درصورت وجود لیستریا منوسیتوژنز ایجاد کانژنکتیویت همراه با آسیب قرنیه پس از۴۸ ساعت می گردد
نکته : تست کمپ درلیستریا منوسیتوژنز مثبت است

نکته : لیستریا منوسیتوژنز ازتخمیر رامنوز ایجاد اسید می کند

یکی از باکتری‌های که از طریق مواد غذایی از جمله شیر خام، سبزیجات (به خصوص کلم) و گوشت به انسان منتقل می‌شود باکتری «لیستریا منوسیتوژنز» است، که باعث بیماری‌های مختلفی از جمله مننزیت، کنژکتیویت، سپتی سمی و سقط جنین می‌شود. منحصرترین شکل بالینی این بیماری عفونت دستگاه تناسلی زنان باردار و عفونت فرزندان قبل از تولد یا در زمان زایمان است. لیستریا تمایل شدیدی به جفت و جنین و سیستم عصبی دارد. در عفونت لیستریازیس در زنان باردار معمولا هیچ علامت مشخصی وجود ندارد یا فقط سابقه‌ای از بیماری شبه

آنفولانزا و خود محدود شونده در مدت سه ماهه آخر بارداری وجود دارد. اما علایمی همچون تیره شدن مایع آمنیوتیک، دردکمر، تب و لرز، زایمان زودرس و التهاب کلیه و لگن می‌تواند از نشانه‌های لیستریازیس باشد. دوره کمون این بیماری ۳۱ روز است ولی می‌تواند بین ۱۱ تا ۶۲ روز متغیر باشد. برای تشخیص بیماری از خون، مایع مغزی نخاعی، مایع آمنیوتیک و ترشحات سیستم تناسلی نمونه‌گیری می‌شود. استفاده از آنتی بیوتیک‌های سولفامتوکسازول، تری متوپریم و آمپی سیلین برای درمان توصیه می‌گردد. مهمترین و مطمئن‌ترین راه برای پیشگیری دقت در مصرف مواد غذایی سالم و بهداشتی می‌باشد.

تست حرکت: این باکتری حرکت خاصی موسوم به حرکت چتری در محیط حرکت دارد که وجه مشخصه ان می باشد.باکتری این حرکت را در دمای ۲۲ در جه اتاق دارا می باشد اما در دمای ۳۷ درجه فاقد تحرک می باشد

حرکت چتری لیستریا در محیط motility

**تست بایل اسکولین:**باکتری لیستریا قادر به هیدرولیز اسکولین در مجاورت املاح صفراوی می باشد که با کشت در محیط بایل اسکولین ان را تجزیه کرده و به اسکولیتین تبدیل نموده و در مجاورت معرف محیط که سیترات فریک میباشد واکنش داده و نمای قهوه ای رنگ ایجاد میکند .این باکتری دارای همولیز خفیف گلبول های قرمز می باشد.

# جلسه پنجم: باسیل‌های گرم مثبت اسپور دار

ویژگی مشترک این باکتری‌ها این است که همگی باسیل گرم مثبت و اسپوردار می باشند. دو جنس مهم این باکتری‌ها که از نظر پزشکی و بیماری زایی حائز اهمیت هستند شامل:

۱. جنس باسیلوس (Bacillus) که هوازی است.
۲. جنس کلستریدیوم (Clostridium) که بی هوازی است.

سابقاً هر دو جنس این باکتری‌ها در خانوادهٔ "Bacillaceae" قرار داشتند اما در طبقه بندی جدید اعضای جنس کلستریدیوم در خانواده"Clostridiaceae " قرار گرفتند.

باکتریهای این دو جنس باسیلهای گرم مثبت ، اسپور دار و درشت می باشند و در خاک ، آب و روده انسان یا حیوانات به وفور مختلف یافت می شوند. اسپور آنها ممکن است به شکل گرد یا بیضی باشد. همچنین در زیر یکروسکوپ اسپور آنها به یکی از اشکال مرکزی ، انتهایی یا نزدیک به انتها دیده می‌شود و از این خاصیت در شناسایی برخی گونه‌های مختلف این جنس‌ها می‌توان استفاده کرد. در برخی از آنها چون قطر اسپور باکتری بیشتر است، باعث تغییر شکل باسیل می گردد.

## باسیلوس‌های

در بین باسیلوسهای شناخته شده، دو گونه از نظر بیماری زایی برای انسان اهمیت بیشتری دارد :

۱. باسیلوس آنتراسیس (*B.anthracis*) که می تواند در انسان و حیوان ایجاد بیماری سیاه زخم (Anthrax) نماید. این بیماری در انسان به سه شکل پوستی ، تنفسی و گوارشی دیده می شود. امروزه متاسفانه در بیوتروریسم نیز از آن استفاده می شود. باسیلوس آنتراسیس که سابقًا به آن باسیل شاربن گفته می شد، باکتری است هوازی ، گرم مثبت ، درشت ، بی حرکت که اسپور آن بیضی شکل بوده و در مرکز قرار دارد. نکته مهم در تشخیص احتمالی این باکتری در زیر میکروسکوپ این است که دوا نتهای باکتری زاویه دار است و باسیل‌ها به شکل تقریباً یک مستطیل با اندازه (۸-۴) × (۱-۰,۵) میکرومتر می‌باشد. باید توجه داشت که در نمونه های بالینی، باسیلها به صورت تک تک ، دوتایی و یا زنجیره های کوتاه با کپسول و بدون اسپور دیده می شوند. در حالی که در نمونه‌های گرفته شده از خاک و یا لاشه حیوانات باکتری بدون کپسول و دارای اسپور مشاهده می‌شود. همچنین درگسترش تهیه شده از کشت، باسیل شاربن به صورت زنجیره های بلند و درهم پیچیده مشاهده می شود. برای اینکه باکتری در محیط آزمایشگاه کپسول تولید کند، می‌توان از $CO_2$ یا بی‌کربنات استفاده کرد.

این باکتریها به آسانی روی ژلوز ساده در حرارت $37^{\circ}C$ رشد می‌کنند ولی اگر در حرارت $43^{\circ}C$ کشت داده شوند قدرت بیماری زایی خود را از دست می‌دهد. کلنی‌های این باسیل برجسته ، غیر منظم و خشن بوده و اطراف آن رشته هایی شبیه به موی مجعد (Medusa head) وجود دارد و از این نظر به آنها کلنی‌های ریزوئید (Rhizoid colony) می گویند.

کشت عمقی باسیلوس آنتراسیس در ژلاتین به صورت عمودی، ایجاد پدیده ای به نام "سرو وارونه" می کند. علت این پدیده این است که باکتری ضمن رشد و تکثیر در طول خط کشت ، رشته هایی به اطراف می فرستد. این رشته ها در بالا طول بیشتری دارند و پس از ۲۴ ساعت در حرارت $22^{\circ}C$ منظره ای شبیه به سرو وارونه پیدا می کند. سپس ژلاتین را به کندی از بالا به پایین ذوب می نماید. باسیلوس آنتراسیس نیترات را به نیتریت احیا کرده و نشاسته را هیدرولیز می کند . آزمایش ووئس پروسکوئر (VP) نیز مثبت است. این باکتری فاقد حرکت می‌باشد.

۲. باسیلوس سرئوس (*B.cereus*) که عامل مسمومیت غذایی بوده و علاوه براین می تواند به عنوان پاتوژن فرصت طلب عفونت‌های مختلفی از جمله باکتریمی و عفونت‌های چشمی در افردا مستعد ایجاد کند. کلنی این باکتری بر روی محیط بلاد آگار دارای همولیز بتا بوده و شمای شیشه‌ای دارد. تست لستیناز این باکتری مثبت بوده و قادر به تخمیر اسلیسین می-باشد.

۳. آنتروکوئیدها(Anthracoids) یا گونه‌های شبه آنتراسیس به گونه‌های دیگر جنس باسیلوس اطلاق می‌گردد که گاه متحرک و عموماً بدون کپسول هستند، سرو وارونه ایجاد نمی کنند، ژلاتین را به سرعت ذوب می کنند و ممکن است به صورت باسیلهای گرم منفی بنظر برسند. برخی از باسیلوسها به علت قدرت تخمیری زیاد باعث تجزیه مواد قندی و پروتئینی شده و در فساد مواد غذایی نقش دارند. این باکتریها به حالت ساپروفیت در هوا، خاک ، آب ، شیر، سبزیجات ، گرد و غبار، مد فوع و ... زندگی می کنند، که از نظر شکل ظاهری و رنگ آمیزی به باسیلوس آنتراسیس شباهت دارند و آنتراکوئید نامیده می شوند.

## افتراق باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس سرئوس

جدول زیر به واکنش‌های شیمیایی و خصوصیات *B.anthracis* و *B.cereus* را بیان می‌کند.

| خصوصیات | *B.anthracis* | *B.cereus* |
|---|---|---|
| ایجاد همولیزبتا بر روی محیط بلاد آگار گوسفندی | − | + |
| تحرک | − | + |
| حساسیت به پنی‌سیلین | S | R |
| تخمیر سالیسین | − | + |
| واکنش رشته مروارید" String of pearls " | + | − |
| هیدرولیز ژلاتین | + (نمای سرو وارونه) | + |
| رشد بر روی محیط فنیل اتیل الکل | − | + |
| تولید لسیتیناز | + | + |

### ✓ واکنش زنجیره مروارید

از این تست در گذشته به صورت گسترده در تشخیص *B.anthracis* از *B.cereus* استفاده می‌کردند. اساس این تست حساسیت *B.anthracis* به پنی‌سیلین می‌باشد.

روش کار: در این تست ایزوله باکتریایی مشکوک را به محیط آگار حاوی پنی‌سیلین (0.05 to 0.5 U/mL) تلقیح می‌کنند. پس از انکوباسون ۳ تا ۶ ساعته در درجه حرارت $37^{\circ}C$، از نواحی تلیقح شده یک اسمیر تهیه کرده و زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شود. واکنش مثبت زنجیره مروارید بدین صورت است که یک رشته از کوکسی‌های درشت که همان باسیل‌های شاربن می‌باشند در زیر میکروسکوپ به جای یک رشته باسیل دیده می‌شوند. علت این پدیده حساسیت باسیل شاربن به پنی‌سیلین و عدم ساخت دیواره سلولی و در نتیجه عدم طویل شدن سلول وکروی ماندن آن می‌باشد.

### ✓ تست ژلاتیناز

توانایی برخی ارگانیسم‌ها در تولید یک پروتئاز قوی به نام ژلاتیناز و تجزیه ژلاتین و مایع ساختن آن اساس مثبت شدن این تست می-باشد. در این تست از محیط نوترینت ژلاتین و درون لوله استفاده می‌شود. در این محیط به جای آگار از ژلاتین برای سفت شدن محیط استفاده می‌شود. بنابراین با تجزیه ژلاتین توسط ارگانیسم‌های ژلاتیناز مثبت محیط از حالت جامد به مایع تغییر می‌یابد.

روش کار: ۴ تا ۵ قطره از محیط کشت مایع یا یک کلنی کمل از محیط کشت جامد ۲۴ ساعته حاوی ارگانیسم مورد نظر را به صورت عمقی تا عمق ۱۲ میلیمتر در محیط کشت می‌دهیم. محیط‌ها را در دمای $35^{\circ}C$ تا $37^{\circ}C$ تا ۴ روز انکوبه کرده و هر روز محیط‌ها را چک می‌کنیم. هر بار که از انکوباتور در آوردیم در دمای $4^{\circ}C$ (دمای یخچال) قرار می‌دهیم. این کار برای کنترل مایع شدن ژلاتین به دلیل گرما و نه تجزیه آنزیمی می‌باشد. بهتر است یک محیط ژلاتین که ارگانیسمی در آن تلقیح نشده نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شود.

## کلستریدیوم‌ها

جنس کلستریدیوم شامل باسیلهای درشت و گرم مثبت می باشند. بی هوازی مطلق یا ندرتآ میکروائروفیل بوده و تولید اسپور می نمایند. اسپور به شکل گرد یا بیضی بوده و حجم آنها اغلب از عرض باسیل زیادتر است و موجب پیدایش برجستگی در باسیل می گردد. اکثر کلستریدیوم‌ها فاقد کپسول بوده و متحرکند ولی کلستریدیوم پرفرنژنس(*C.perfringens*) وکلستریدیوم بوتیریکوم (*C.butyricum*) کپسول دار و بی حرکت هستند . اغلب کلستریدیومها ساپروفیت بوده و در روده و مدفوع انسان و حیوانات مختلف یافت می شوند. اکثر آنها فاقد کاتالاز ، سیتوکروم اکسیداز و پراکسیداز می باشند و اکثرًا انرژی خود را از راه تخمیر قندها یا مصرف اسیدهای آمینه بدست می آورند. برخی نیز دارای آنزیم پروتئولیتیک هستند. اکثرًا در زخمهای نکروزه ، کلستریدیومها به همراه باکتریهای گرم منفی مانند اشریشیاکلی بوده و به همین دلیل به منظور جداسازی کلستریدیومها با توجه به مقاومت اسپورهابه حرارت، از روش شوک حرارتی استفاده می شود. یعنی ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از کشت در محیط تیوگلیکولات و مشاهده اسپور در کشت مایع ، به مدت نیم

ساعت در حرارت $80^{\circ}C$ نگه داشته ، در این حرارت اسپورها زنده مانده و سایر باکتری‌ها از بین می روند . سپس از این مایع برروی محیط بلاد آگار کشت داده می شود.

در بین انواع بیماریزا, کلستریدیوم بوتولینوم (*C.botulinum*) عامل مسمومیت غذایی بوتولیسم، کلستریدیوم تتانی (*C.tetani*) عامل بیماری مهلک کزاز,کلستریدیوم پرفرنژانس(*C.perfringens*)، کلستریدیوم سپتیکوم (*C.septicum*) و کلستریدیوم نووای (*C.novyi*) مهمترین عوامل ایجاد کنندهٔ میونکروزیس می باشند. تخمیر قندها نقش مهمی در تشخیص این باسیلها از یکدیگر دارد. ضمناً می توان برای تشخیص انواع کلستریدیوم‌های هیستوتوکسیک ازهم چگونگی وضعیت سموم آنهارابررسی کرده و همچنین از تست ناگلر نیز کمک گرفت.

کلستریدیوم بوتولینوم عامل بیماری مهلک بوتولیسم، باسیل درشتی است که دو سر آن گرد است. اسپور بیضی شکل و نزدیک به یک انتها است و موجب برجستگی در انتهای باسیل می شود. این باکتری متحرک وفلاژل آن ازنوع پری تریش می باشد. کلستریدیوم بوتولینوم از تخمیر قند انرژی خود را کسب می‌کند.

کلستردیوم تتانی یا باسیل نیکولایر عامل بیماری کزاز می باشد . این باکتری دارای اسپورانتهایی بزرگی است که ظاهری شبیه چوب طبل برای باکتری ایجاد می کند . این باکتری متحرک وفلاژل آن ازنوع پری تریش می باشد. کلستردیوم تتانی درسطح آگار خوندار ایجاد همولیز بتا وسوارمینگ کرده و قند هاراتخمیر نمی کند.

کلستریدیوم پرفرنژنس دارای دو سر گرد و یک اسپور نزدیک به انتها و بیضی شکل است. ولی چون قطر اسپور کم است برجستگی ایجاد نمی کند.

کلستریدیوم سپتیکوم دارای دو سر گرد بوده که گاه مستقیم و گاهی خمیده و به صورت پلئومرف مشاهده می گردند. اسپور بیضی شکل ، مرکزی یا نزدیک به انتهاست.

- ✓ **کشت کلستریدیوم‌ها**

برای کشت کلستریدیوم‌ها از محیط‌های کشت تایوگلیکولات غنی شده، محیط کشت Cooked Meat Broth و بلاد آگار می‌توان جهت کشت استفاده کرد. برای کشت پلیت ها باید به مدت ۴۸ساعت درشرایط بی هوازی (۸۰٪ درصد نیتروژن ، ۱۰درصد گازکربونیک .۱۰ درصد هیدروژن) در $37^{\circ}C$ قرار گیرد.

- ✓ **تشخیص آزمایشگاهی کلستریدیوم‌ها**

**بررسی میکروسکوپی**

تنها می‌توان در مورد *C.tetani* از بررسی میکروسکوپی به عنوان یک معیار تشخیصی قابل اعتماد به تنهایی استفاده کرد. بدین صورت که باسیل‌های مشخص به شکل چوب طبل یعنی یک انتهای طویل و یک انتهای گرد در نمونه‌های اخذ شده از زخم دیده شوند، می‌توان تشخیص *C.tetani* را داد

## بررسی بیوشیمیایی

جدول زیر تفاوت‌های بیوشیمیایی بین گونه‌های مختلف کلستریدیوم‌ها را نشان می‌دهد.

| گونه | سوارمینگ | تحرک | اندول | لستیناز | لیپاز | هیدرولیز ژلاتین |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *C.tetani* | + | + | - | - | - | + |
| *C.botulinum* | - | + | - | - | + | + |
| *C.perfringens* | - | - | - | + | - | + |
| *C.difficile* | - | + | - | - | - | - |
| *C.septicum* | + | + | - | - | - | - |
| *C.sordellii* | - | + | + | + | - | - |
| *C.novyi* | - | + | - | + | + | + |

### ✓ آزمون بررسی ترشح لسیتیناز

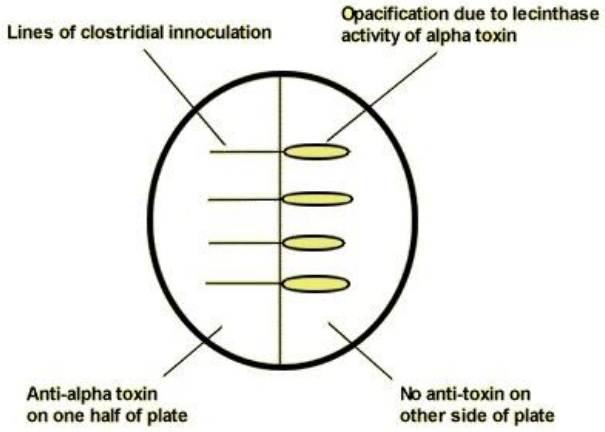
آنزیم لسیتیناز باکتری قادر است که لسیتین ( ماده طبیعی درزرده تخم مرغ ) رابه دی گلیسیریدهای نامحلول تبدیل کند که منجر به تولید هاله ای سفید رنگ تا مات دراطراف کلنی درمحیط کشت حاوی لسیتین می شود .

روش کار : یک کلنی خالص رابرروی محیط کشت آگار زرده تخم مرغ (Egg Yolk Medium) منتقل کنید. سپس پلیت رابه مدت ۲۴ تا۴۸ ساعت دردمای $36^{\circ}C$ قرار دهید بعد از این مدت پلیت ها را ازنظر کلنی‌های باهاله ای از رسوب سفید رنگ بررسی می شود .

### ✓ تست ناگلر (ممانعت از آلفا لسیتیناز )

روش کار: ازپلیت بلاد آگار با۱۰ درصد زرده تخم مرغ (Egg Yolk Medium) استفاده می شود. به وسیله سواب کلنی رادرسطح پلیت کشت داده نیمی از سطح محیط کشت راباآنتی توکسین آلفا لسیتیناز بپوشانید ودردمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴تا ۴۸ ساعت نگهداری کنید. درنیمه فاقد آنتی توکسین اطراف کلنی ها هاله کدری مشاهده می شود ولی در نیمه دیگر هاله موجود نیست که به علت آنتی توکسین می باشد.

نکته : تست لسیتیناز در کلستریدیوم پرفرنژنس، کلستریدیوم باراتی ، کلستریدیوم بایفرمنتاس و کلستریدیوم سوردلی مثبت است. به همین دلیل تست لسیتیناز نمی تواند به تنهایی تائید کننده قطعی یک گونه خاص باشد و باید برای تشخیص قطعی ترشح الفا لسیتیناز توسط تست ناگلر که از آنتی توکسین اختصاصی توکسین هر گونه استفاده می‌شود، بررسی شود.




- ✓ **تست لیپاز**

آنزیم لیپاز ترشحی برخی باکتری‌ها دی‌گلیسیریدها و تری‌گلیسیریدها را به اسیدهای چرب و گلیسرول تجزیه می‌کند. باکتری‌های تولید کننده لیپاز بر روی محیط زرده تخم مرغ (Egg Yolk Medium) کلنی‌هایی با نمای رنگین کمانی و درخشنده تشکیل می‌دهند. اطراف کلنی‌ها نیز یک هاله درخشنده رنگین کمانی دیده می‌شود.

## رنگ آمیزی اختصاصی اندوسپور

روش‌ها و تکنیک‌های مختلفی برای رنگ آمیزی اندوسپور باکتری‌ها تا کنون معرفی شده اند. در تمام روش‌ها یک رنگ به عنوان رنگ اصلی (برای رنگ آمیزی اسپور) و رنگ دیگری به عنوان رنگ زمینه (رنگ آمیزی سلول رویشی) استفاده می‌شود. از آنجا که اندوسپور باکتری‌ها به جذب رنگ مقاوم بوده و به راحتی رنگ نمی‌گیرند، لذا معمولاً از حرارت برای افزایش جذب رنگ توسط اندوسپور استفاده می‌شود.

انواع رنگ آمیزی اختصاصی اندوسپور

- ✓ روش دورنر ( Dorner’s method)

از کاربول فوشین به عنوان رنگ اصلی برای رنگ آمیزی اندوسپور و از محلول نیگروزین به عنوان رنگ زمینه برای رنگ آمیزی سلول رویشی باکتری استفاده می‌شود. سلول باکتری به صورت بیرنگ در زمینه سیاه رنگ و اندسپور به رنگ قرمز رنگ دیده می‌شود.

- ✓ روش شافر یا روش ویرتز (Schaeffer-Fulton’s or wirtz’s method)

از مالاشیت گرین به عنوان رنگ اصلی برای رنگ آمیزی اندوسپور و از سافرانین به عنوان رنگ زمینه برای رنگ آمیزی سلول رویشی باکتری استفاده می‌شود. سلول باکتری به صورت قرمز رنگ و اندسپور به رنگ سبز رنگ دیده می‌شود.

- ✓ روش مولر (Moeller's method)

از کاربول فوشین به عنوان رنگ اصلی برای رنگ آمیزی اندوسپور و از متیلن بلو به عنوان رنگ زمینه برای رنگ آمیزی سلول رویشی باکتری استفاده می‌شود. سلول باکتری به صورت آبی رنگ و اندسپور به رنگ قرمز رنگ دیده می‌شود.

## مراحل انجام روش شافر یا روش ویرتز

۱. یک گسترش تقریباً ضخیم از باکتری بر روی اسلاید تهیه کنید.
۲. گسترش را با حرارت ثابت نمایید.
۳. محلول ٪۵ مالاشیت گرین را روی گسترش ریخته و ۵ دقیقه به ملایمت حرارت دهید تا بخار متصاعد شود ولی رنگ نجوشد و خشک نشود.
۴. روی اسلاید را با آب بشویید.
۵. محلول ٪۵ سافرانین روی گسترش ریخته و ۳ دقیقه صبر کنید (بدون اعمال حرارت).
۶. اسلاید را با آب بشویید. پس از خشک کردن اسلاید با استفاده از عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ آن را مطالعه نمایید .

نتیجه: اسپورها به رنگ سبز و باسیل‌ها به رنگ قرمز دیده می شوند

## جلسه ششم: باسیل‌های گرم منفی تخمیری (انتروباکتریاسه)

خانواده انتروباکتریاسیه باسیلهای گرم منفی بدون اسپور، اکسیداز منفی ، گلوکز مثبت بوده که قادرند نیترات ها را به نیتریت احیاء کنند. برخی متحرک و بعضی دارای کپسول هستند. این باسیلها از نظر شکل شبیه یکدیگر به طول ۲ تا ۴ و عرض ۰,۵ تا ۲ میکرومتر بوده و به خوبی برروی محیطهای ساده مانند ژلوز مغذی رشد کرده و کلنی های مشابهی ایجاد می کنند. چون در اکثر نمونه های بالینی (مثل مدفوع) با باکتریهای دیگر مخلوط هستند برای جداسازی آنها از محیط های انتخابی استفاده می نمایند. وجود رنگها (بریلیانت گرین یا کریستال ویوله) ، نمکهای صفراوی (مانند دزاکسی کلات سدیم) در این محیط ها از رشد باکتریهای گرم مثبت و برخی از باکتری‌های گرم منفی غیر بیماریزای روده ای ممانعت به عمل می‌آورند. براساس غلظت این عوامل، محیطهای فوق الذکر را به سه گروه زیر تقسیم می نمایند:

۱. محیط های Low selective مانند مکانکی (MacConkey) و یا ائوزین متیلن بلو (EMB)
۲. محیط های Moderate selective سالمونلا، شیگلا آگار (SS)، دزاکسی کلات سیترات آگار و هکتون انتریک آگار (HE)
۳. محیطهای High selective مانند بریلیانت گرین آگار یا بیسموت سولفیت آگار.

برای جداسازی پاتوژن های این خانواده (نظیرسالمونلا و شیگلا) از نمونه مدفوع بیماران میتوان از محیط های غنی کننده مانند تتراتیونات (tetrationate broth) یا سلنیت اف (selenit F. broth) استفاده نمود. ترکیبات این محیطها رشد سالمونلا و شیگلا را افزایش داده و از رشد باکتریهای فلور نرمال روده ممانعت می نمایند. پس از جدا سازی اولیه، این باکتریها را بر اساس روشهای بیوشیمیایی و یا سرولوژیک تعیین هویت مینمایند. از جمله آزمایشهای بیوشیمیایی که در تشخیص اولیه این باکتریها کاربرد فراوان دارد آزمایشهای چهارگانه (Indole, Methyl Red, Voges Proskauer, Citrate ) IMViC میباشد که بعدا به آنها اشاره میشود.

- ✓ **محیط مکانکی آگار(MacConkey agar)**

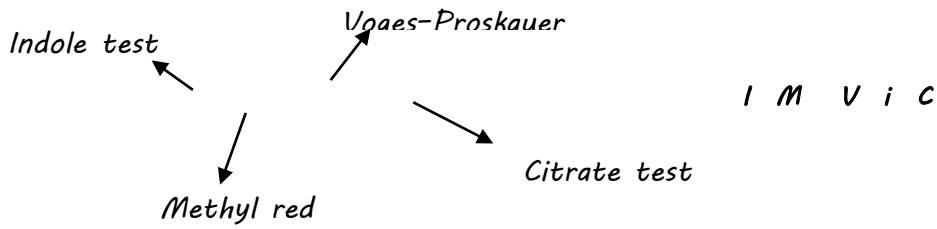
یک محیط کشت (differential) و افتراقی (Selective) می‌باشد.

اساس آزمایش: محیط کشت مکانکی محیطی انتخابی باسیلهای گرم منفی انتروباکتریاسه به کار می رود. این محیط حاوی پپتون، نمکهای صفراوی(bile salt) ، رنگ کریستال ویوله، کلرورسدیم، لاکتوز، معرف قرمز خنثی (Natural Red) و آگار است. انتخابی بودن محیط به علت کریستال ویوله و نمکهای صفراوی است که از رشد باکتریهای گرم مثبت و بسیاری از باکتریهای گرم منفی جلوگیری می کنند **(انتخابی بودن محیط)**. باسیلهای گرم منفی روده ای بر سطح این محیط به خوبی رشد کرده و براساس تخمیر لاکتوز از هم تفکیک می شوند **(افتراقی بودن محیط)**. باکتری‌هایی که لاکتوز را تخمیر می نمایند، کلنی های صورتی یا قرمز و آنهایی که لاکتوز را تخمیر نمی نمایند، کلنی های بی رنگ ایجاد می کنند.

- ✓ **محیط EMB (Eosin methylene blue agar)**

این محیط کشت ، محیط افتراقی مفیدی در جداسازی و شناسایی باکتری های روده ای گرم منفی است. املاح صفراوی و رنگ های ائوزین (Eosin Y) و متیلن بلو (methylene blue)، اجزاءانتخابی هستند که افزوده شده اند. تا در حالی که به باکتری های گرم منفی روده‌ای اجازه رشد می دهند، از رشد باکتری های گرم مثبت و برخی باکتری‌های گرم منفی جلوگیری کنند**(انتخابی بودن محیط)**. کربوهیدرات های لاکتوز وسوکروز افزوده شده اند تا ایزوله‌ها را بر اساس تخمیر لاکتوز تفکیک کنند. تخمیر لاکتوز موجب افت pH و متعاقب آن تغییر رنگ معرف‌ها که همان ائوزین (Eosin Y) و متیلن بلو (methylene blue) هستند، مشخص و ارزیابی می شود**(افتراقی بودن محیط)**.کلنی باکتری‌های تخمیر کننده لاکتوز در محیط EMB به دلیل تغییر رنگ معرف به رنگ ارغوانی تیره دیده می‌شوند،در حالی که باکتری‌های غیر تخمیر کننده لاکتوزکلنی بی‌رنگ از خود نشان می‌دهند. *E. coli* یک کلی فرم تخمیر کننده لاکتوز است که به طور شاخص و تیپیک، کلونی های آبی سیاه با درخشندگی فلزی متمایل به سبز ایجاد می کند (جلای فلزی).

- ✓ **تست IMViC**



از این تست برای تمایز قائل شدن بین باسیلهای گرم منفی روده به بویژه اشرشیاکلی و گروه انتروباکتر –کلبسیلا استفاده می شود این تست شامل چهار تست مختلف است:

۱. "I" Indole Test

۲. "M" Test Methyl red

۳. "V" Voges-Proskauer Test

۴. "C" Citrate utilization Test

"i" برای تسهیل در تلفظ اضافه شده است.

✓ **Indole Test**

ایندول توسط بعضی از میکروارگانیسم های معین در تریپتون برات تولید می شود . تریپتون برات غنی از اسید امینه تریپتوفان است که توسط این باکتریها به عنوان منبع کربن ونیتروژن و انرژی استفاده می شود. همه باکتریها و حتی همه باکتریهای روده ای گرم منفی قادر به مصرف تریپتوفان و تولید ایندول با این روش نیستند. بنابراین تولید ایندول می تواند یک روش تشخیص باشد. بعد از انکوبه کردن ۲۴ ساعته با اضافه کردن چند قطره معرف الکلی به نام پارادی متیل آمینوبنزآلدئید ( معرف کواکس) در صورت وجود اندول ، کمپلکس قرمز رنگی ایجاد می شود. اگر حلقه قرمز رنگی در بالای محیط ایجاد شد، آزمایش اندول مثبت و اگر حلقه زرد رنگ ایجاد شد، آزمایش منفی است.

✓ **Methyl red Test**

اساس این تست بر پایه تولید مقادیر فراوانی اسیدهای لاکتیک ، فرمیک ، استیک و سوکسینیک از گلوکز توسط باکتری‌ها است. اشرشیاکلی گلوکز را تخمیر کرده و انواع اسیدهای فوق را به عنوان محصول فرعی یا نهایی تولید می می کند. برای انجام تست به محیط کشت ۲۴ ساعته MR-VP ، ۵ قطره معرف متیل رد اضافه نموده و سپس تغییر رنگ محیط را مورد بررسی قرار می دهند. اشرشیاکلی بعد از رشد pH محیط رابه۴/۵ یا کمتر رسانده بنابراین رنگ متیل رد به قرمز تبدیل می شود.

✓ **Voges-Proskauer (VP) Test**

اساس این تست بر پایه تولید استیل متیل کربونیل یا همان استوئین (که یک ماده خنثی است ) از گلوکز می باشد . بعد از مدت انکوباسیون محیط MR-VP، دو معرف آزمایش یعنی محلول آلفا نفتل و پتاس را اضافه نموده و لوله را خوب تکان می دهند، تا محیط با اکسیژن مواجه گردد. در صورت مثبت شدن تست رنگ قرمز تشکل می شود. اشرشیاکلی نمی تواند استیل متیل کربونیل تولید کند در صورتیکه انترو باکتر کلبسیلا می تواند .

✓ **Citrate Utilization Test**

اساس این تست بر پایه آن است که بعضی از باکتریها قادرند سیترات سدیم را به عنوان تنها منبع کربن استفاده نمایند. در حقیقت در این محیط تنها سیترات سدیم به عنوان منبع کربن بوده و باکتری‌هایی که بتوانند از این ترکیب به عنوان منبع کربن استفاده کنند می‌توانند در محیط رشد کنند.

برای انجام این تست از محیط سیمون سیترات استفاده میشود. محیط کشت سیمون سیترات محیطی است سبز رنگ و شیب دار که حاوی سیترات می باشد که اگر باکتری دارای انزیم سیتراتاز یا سیترات لیاز باشد با مصرف و تبدیل ان به کربنات سدیم رنگ محیط را از سبز به ابی تغییر می دهد.

جدول **IMViC** برای برخی از گونه‌های انتروباکتریاسه

| Species | Indole | Methyl Red | Voges-Proskauer | Citrate |
|---|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | Positive | Positive | Negative | Negative |
| *spp. Shigella* | Negative | Positive | Negative | Negative |
| *spp.Salmonella* | Negative | Positive | Negative | Positive |
| *spp.Klebsiella* | Negative | Negative | Positive | Positive |
| *Proteus vulgaris* | Positive | Positive | Negative | Negative |
| *Proteus mirabilis* | Negative | Positive | Negative | Positive |
| *Citrobacter freundii* | Negative | Positive | Negative | Positive |
| *Enterobacter aerogenes* | Negative | Negative | Positive | Positive |

## سایر تست‌های بیوشیمیایی روتین برای شناسایی انتروباکتریاسه

- ✓ **محیط TSI (Triple Sugar Iron)**

این محیط بطور گسترده در تشخیص باکتریهای روده‌ای ( اعضای خانواده انتروباکتریاسه ) کاربرد دارد. که بصورت شیب دار (slant) در لوله آزمایش ساخته می شود و سطح بیشتری برای رشد باکتریها فراهم می‌آورد . کشت در محیط جامد بصورت عمقی ـ سطحی می گیرد.

محیط TSI حاوی معرف فنل ـ رد ، فروس سولفات ، تیو سولفات سدیم ( برای تشخیص تولید گاز سولفید هیدروژن ) و سه قند گلوگز ، لاکتوز و سوکروز است که غلظت گلوکز درمحیط ۰/۱ غلظت دو قند دیگر می باشد .دامنه PH محیط از6.5 تا 8.4 متغیر می باشد . این محیط قبل از کشت به دلیل داشتن معرف فنل ـ رد قرمز رنگ است.

با استفاده از TSI می توان سه خصوصیت را در یک باکتری مشخص نمود.

الف : توانایی تولید گاز $H_2$ , $CO_2$ از متابولیسم قندها. در این محیط کشت تولید گاز به یکی از شکل های زیر مشخص می گردد: ایجاد حباب در محیط جامد، ایجاد شکاف یا ترک در محیط کشت، جابه جا شدن محیط کشت.

ب : توانایی تولید مقادیر زیادی گاز سولفید هیدروژن که از طریق سیاه شدن محیط مشخص می شود. بسیاری از باکتری‌ها همچون پروتئوس می-توانند از Thiosulfate anion به عنوان پذیرنده نهایی الکترون در چرخه انتقال الکترون استفاده کرده و این ترکیب را به سولفید احیا کنند. پس از آن سولفید درون سلول به $H_2S$ تبدیل می‌شود. سپس $H_2S$ تولید شده با فروس سولفات واکنش داده و ترکیب فروس سولفید تولید شده که این ترکیب یک ماده سیاه رنگ است و محیط کشت را سیاه می کند.

ج : توانایی تخمیر گلوکز ، لاکتوز و سوکروز:

به دلیل اینکه تمام اعضای انتروباکتریاسه قادر به تخمیر گلوکز هستند، در ساعات اولیه انکوباسیون (۸ تا ۱۲ ساعت) PH تمامی نقاط محیط کشت اسیدی و در نتیجه محیط زرد رنگ است اما گلوکز موجود در سطح به پایان رسیده و باکتریها شروع به تجزیه پپتون موجود در محیط می‌نمایند .از تجزیه پپتون در شرایط هوازی آمونیاک ($NH_3$ ) تولید می‌شود. محصولات این عمل خاصیت قلیایی داشته و در نتیجه رنگ سطح محیط مجدداً قرمز می شود. اکسیژن موجود در سطح شیب دار محیط نیز سبب اکسید شدن فراورده‌های اسیدی حاصل از تخمیر و خنثی کردن خاصیت اسیدی آنها می‌شود. درهمین حال عمق محیط بدلیل سیر آرامتر تخمیر بی هوازی گلوکز و نبود اکسیژن برای اکسید کردن اسیدهای تولید شده، همچنان اسیدی و زرد رنگ باقی می‌ماند. این اتفاق ۱۸تا ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون رخ می‌دهد. در این حالت محیط به شکل قرمز در سطح و زرد در عمق در می‌آید.

اما باکتری‌هایی که توانایی تخمیر لاکتوز یا سوکروز را دارند پس از اتمام گلوکز شروع به تخمیر این قندها کرده و به شدت محیط را کاملا اسیدی می کنند، چرا که میزان این دو قند در محیط ده برابر گلوکز می‌باشد. این مقدار اسیدی شدن انقدر بالاس که اکسیژن هوا قادر به اکسید کردن اسیدهای تولید شده از تخمیر در مدت ۲۴ ساعت نبوده و از طرفی باکتری به دلیل وجود لاکتوز یا سوکروز دیگر پپتون محیط را تجزیه نمی کند. بنابراین تمام محیط زرد رنگ می‌ماند.

حالت سوم زمانی است که باکتری مورد آزمایش از جنس انتروباکتریاسه نبوده و حتی قدرت تخمیر گلوکز را نیز نداشته باشد. بنابراین تمام محیط به رنگ قرمز می‌ماند چراکه هیچ قندی تخمیر نمی‌شود تا اسید تولید شود.

Alk/A : سطح قرمز و عمق زرد ← تخمیر گلوکز و عدم تخمیر لاکتوز یا سوکروز.

A/A : سطح و عمق هر دو زرد ← تخمیر گلوکز، تخمیر لاکتوز یا سوکروز (یا هم لاکتوز و هم سوکروز).

Alk/Alk : سطح و عمق هر دو زرد عدم تخمیر هر سه قند.

- ✓ **کشت در محیط اوره (آزمایش اوره آز )**

اساس آزمایش: اساس این آزمایش بر مبنای تولید اوره آز و هیدرولیز اوره در باکتریها می باشد.از آنجا که در این محیط

محیط اوره و معرف فنل رد وجود دارد. در صورت وجود آنزیم اوره آز، اوره هیدرولیز شده و آمونیاک تولید می گردد.

pH قلیایی و در نتیجه ارغوانی یا صورتی پررنگ می شود. ارگانیسمی که اوره‌آز داشته باشد محیط را به رنگ صورتی یا ارغوانی در آورده اما باکتری‌های فاقد این آنزیم تغییر محسوسی در محیط نمی‌دهند.

## جلسه هفتم: باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری/ باسیل‌های خمیده تخمیری(ویبریوها)

### باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری

**سودوموناس آئروژینوزا** *Pseudomonas aeruginosa*

سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی هوازی اجباری و غیر تخمیر کننده بوده و دارای حرکت به واسطه ی فلاژل می باشد . این باکتری فاقد اسپور می باشد. در شرایط بی هوازی فقط نمونه هایی رشد می کنند که قادر به استفاده از نیترات یا آرژینین به عنوان گیرنده نهایی الکترون باشند.

جایگاه آنها در طبیعت، غالبًا آب و خاک بوده و برروی مخاط بدن انسان و حیوانات نیز حضور دارند و یکی ازمهم ترین باکتریهای جدا شده از نمونه های مختلف بالینی و محیطی می باشد. این باکتری همچنین از محیطهای مرطوب مانند وسایل کمک تنفسی، حمام، شیرآب و حتی محلولهای ضد عفونی کننده جدا شده اند.

این تنوع در عفونت های سودوموناسی به دلیل گسترش سازوکار های مختلف اکتسابی از جمله تنظیم بیان ژن است. به علاوه با تشکیل بیوفیلم توانایی محافظت در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضدمیکربی مختلف را ایجاد می کند. سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل عفونت های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی است. این نوع عفونت ها از جمله معضلات و مشکلات مهم پزشکی در کشور های توسعه یافته و در حال توسعه محسوب می شود. عفونت های سودوموناسی غالباً در بیماران سوختگی، دارای نقص ایمنی و مبتلایان به سندرم سیستیک فیبروزیس یک عامل تهدید کننده حیات به شمار می‌آید.

سودوموناس آئروژینوزا در حضور مواد شیمیایی ضد عفونی کننده قادر به رشد بوده و به علت مقاومت آنتی بیوتیکی از اهمیت خاصی برخوردار است. این باکتری دارای مقاومت ذاتی به پنی سیلین و اکثر آنتی بیوتیک های بتالاکتام بوده، و در سال‌های اخیر به آنتی بیوتیک های پی پراسیلین، سیپروفلوکساسین، توبرامایسین و ایمی پنم که به آنها حساس بوده، نیز در حال مقاوم شدن می‌باشد.

### تشخیص آزمایشگاهی

سودوموناس آئروژینوزا بر روی تمام محیط‌های معمولی آزمایشگاهی در حرارت ۳۷ تا ۴۲ درجه سلسیوس به خوبی رشد می کند. این باکتری به علت توانایی رشد در حرارت ۴۲ درجه با انواع دیگر سودوموناس ها تفاوت دارد. این باکتری می‌تواند ژلاتین را به سرعت مایع کند.

سودوموناس آئروژینوزا در محیط قادر به تولید پیگمان آبی پایوسیانین می‌باشد. این پیگمان سبب رنگی شدن کلنی ها نمی گردد بلکه در داخل محیط کشت پخش می شود. پیگمان پیوسیانین فقط در سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد. بعضی از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا پیگمان فلورسنت پیووردین را تولید می کنند که ایجاد رنگ سبز در زیر اشعه UV می کند. بعضی سویه ها پیگمان پیوروبین را تولید می کنند که ایجاد رنگ قرمز تیره را می کند یا پیگمان پیوملانین را تولید می کنند که باعث ایجاد رنگ سیاه می شود.

نکته مهم در مورد این باکتری این است که بر خلاف انتروباکتریاسه اکسیداز مثبت بوده و قادر به تخمیرقندها نمی باشد.

برای تشخیص ابتدا ایزوله باکتریایی را با روش کشت خطی خالص سازی کرده وسپس در محیط های افتراقی کشت می‌دهند. این باکتری چون قادر به تخمیر قندها نمی باشد، تمام محیط TSI را قرمز یعنی قلیایی(Alk/Alk) می کند. پیگمان این باکتری روی محیط TSIبه رنگ خاکستری با جلای جیوه ای رنگ ظاهر می شود . با کشت برروی محیطی نظیر نوترینت آگار ، پیگمان سبز مایل به آبی آن در محیط کاملا مشخص می باشد. این باکتری سیترات مثبت ، اندول منفی ، MRVP منفی و اکسیداز مثبت است.

**اسینتوباکترها**

| تست | سودوموناس | آسینتو باکتر |
|---|---|---|

باکتری مهم دیگری که در گروه باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری قرار می‌دهند گونه‌های اسینتوباکتر هستند که کوکوباسیل های گرم منفی هوازی و غیر تخمیری، کاتالاز مثبت، نیترات منفی، اکسیداز منفی و غیر متحرک بوده که به طوروسیعی در محیط بیمارستان پراکنده و پاتوژن های مهم فرصت طلب مسئول وعفونت های بیمارستانی مختلفی می باشند. این باکتری‌ها می‌توانند در محیط مک کانکی به نسبتی لاکتوز را تخمیر کنند.

اسینتوباکتر بمانی توانایی زیادی برای توسعه سریع مقاومت آنتی بیوتیکی داشته که منجر به مقاومت چند دارویی شده است. درحال حاضر تعدادی از سویه های ، اسینتوباکتر بمانی نسبت به همه عوامل ضد میکروبی مقاوم شده اند .مکانیسم های ایجاد مقاومت از طرق مختلفی صورت می‌گیرد.

واکنش‌های شیمیایی اسینتوباکتر و سودوموناس در جدول زیر بیان شده است.

| | | |
|---|---|---|
| **اکسیداز** | + | − |
| **کاتالاز** | + | + |
| **تخمیر نسبی لاکتوز در محیط مک کانکی** | − | + |
| **حرکت** | + | − |
| **TSI** | ALK/ALK | ALK/ALK |
| **سیمون سیترات** | + | + |

## باسیل‌های خمیده تخمیری(ویبریوها)

ویبریوها باکتری هایی هستند که معمولاً در آب دریاها و آب شور یافت می‌شوند. این جنس جزء خانواده ویبریوناسه است. ویبریوها باکتری خمیده ای به اندازه ی ۰/۵ میکرون در ۱/۵ تا ۳ میکرون شبیه ویرگول، گرم منفی، بدون اسپور، بدون کپسول و متحرک که به خوبی در دمای مختلف از ۱۴ تا ۴۰ درجه سانتیگراد رشد می کند. درجه اپتیمم بین ۱۸ تا ۳۸ درجه سانتیگراد است. ویبریوکلرا (عامل وبا) می تواند در غیاب نمک رشد کند در حالی که اکثر گونه های دیگر این خانواده که در انسان بیماری ایجاد می کنند برای رشد به نمک نیاز دارند این جنس بیش از ۶۰ گونه مختلف دارد که سه گونه آن بیماری زاتر از بقیه هستند.

- ویبریو کلرا (*V.cholera*) که عامل بیماری وبا است.
- ویبریو پاراهمولیتیکوس (*V. parahaemolyticus*) عامل نوعی اسهال خونی.
- ویبریو ولنیفیکوس (*V.vulnificus*) عامل سپتی سمی ناشی از ورود باکتری از طریق زخم‌های پوستی.

جنس ویبریو ، یک گروه وسیع از ارگانیسم های دریایی است که در آن ۳۴ گونه متفاوت وجود دارد از میان گونه های فوق یازده گونه در انسان بیماری زا هستند. در درون این جنس ، ویبریوکلرا عامل بیماری وبای اپیدمیک آسیایی و ویبریو پاراهمولیتیکوس عامل اسهال تابستانی در ژاپن قابل ذکر است. تمامی اعضای این خانواده ارگانیسم های آب زی هستند که گاهی با زئوپلانکتون ها همراهی دارن ، ویبریو ترجیحاً در آب برکه ها و آب شور یافت می شوند . اعضای این خانواده ، باسیل های گرم منفی اختیاری هستند که نیاز غذایی ویژه ای ندارند مانند انترو باکتریاسه. خانواده ی ویبریوناسه از یک متابولیسم تخمیری تنفسی استفاده می کند اما با این حال ، بر اساس مثبت بودن واکنش اکسیداز و داشتن فلاژل قطبی ضخیم غلاف دار از خانواده ی انترو باکتریاسه متمایز می شود.

وبا یک بیماری عفونی حاد و خاص انسان است که توسط ویبریوکلرا ایجاد می شود ، هیچ یک از حیوانات به طور طبیعی به وبا مبتلا نمی شوند. تظاهرات بیماری ناشی از آنتروتوکسینی است که توسط کلنی های ویبریون موجود در روده باریک افراد مستعد ترشح می

شود. وبا از طریق غذا یا آب آلوده منتقل می شود. انتقال مستقیم از فردی به فرد دیگر مشاهده نمی شود زیرا مقدار باکتری مورد نیاز برای تولید بیماری در فردی که اسید معده طبیعی دارد بالاست ( ۱۰۸ ارگانیسم ). دوز عفونی در افرادی که فاقد اسید معده بوده یا اسید معده آنها کم است به میزان ۱۰۵یا ۱۰۳ کاهش می یابد. قدرت انتشار سریع و ابتلای تعداد کثیری از مردم که بدون درمان در مدت چند ساعت از بین می روند بیماری را به صورت تهدیدی بین المللی در آورده است.

گونه های نمک دوست ( halophilic ) ویبریو در گستره متنوعی از pH(۶ تا ۹ ) سازش داشته اما به اسید معده حساس است.اگر تولید اسید معده کم شود یا اسیدیته آن خنثی شود بیمار نسبت به ویبریو حساس خواهد بود. pH برابر با شش محیط را به شدت استریل می کند. تمامی سویه ها دارای لیپوپلی ساکاریدی هستند که حاوی لیپید A ( اندوتوکسین ) پلی ساکارید داخلی و زنجیره جانبی پلی ساکارید O می باشد. پلی ساکارید O به عنوان معیاری برای تقسیم بندی سرگروه ها به کار گرفته می شود. بیش از ۱۴۰ سرگروه برای ویبریوکلره(O1 - O140) ۷۰ سرگروه برای ویبریو ولنیفیکوس و ۱۳ سرگروه برای ویبریو پاراهمولیتیکوس شناسایی شده است. این الگوی طبقه بندی از مدل قبلی آن مزایای بیشتری دارد برای مثال به راحتی می توان فهمید ویبریوکلره O1 و O139 کلراتوکسین تولید کرده و عامل اپیدمی های وبا هستند.

## تشخیص

مناسب ترین روش تشخیص آزمایشگاهی بیماری وبا، کشت مد فوع است. قبل از مصرف آنتی بیوتیک از مدفوع بیمار به کمک رکتال سواب برداشت نموده و ابتدا مدفوع را در محیط غنی کشت می دهند. از این محیط برداشت نموده و روی محیط انتخابی ویبریون وبا (TCBS)کشت داده روی این محیط، ویبریو ها کلنی های زرد رنگ می دهد. ویبریو ها گلوکز را بدون ایجاد گاز تخمیر می کند و لاکتوز آن منفی است. این باکتری در اثر خشکی سرعت نابود می شود ولی در محل مرطوب یک یا چند هفته زنده می ماند ولی در آب های آلوده که محتوی مواد معدنی هستند پس از ۲۴ ساعت کشته می شود. حرارات مرطوب ۵۵ درجه در مدت ۱۵ دقیقه و فنل ۰/۵ درصد آن را در چند دقیقه نابود می کند.

- ✓ نمونه گیری :

نمونه های ارسال به آزمایشگاه جهت تشخیص وبا می توان مدفوع و یا رکتول سواب باشد. بهترین نمونه گیری مدفوع در ابتدای بیماری ترجیحاً ۲۴ ساعت ابتدایی می باشد چرا که در این زمان مقدار باکتری ها به بیشترین مقدار در مدفوع موجودند. لازم است نمونه گیری حتماً قبل از شروع درمان آنتی بیوتیکی باشد. نمونه های مدفوع و یا رکتال سواب را باید در کمترین زمان ممکن به آزمایشگاه تحویل داد تا در محیط کشت مناسب کشت داده شود. نمونه هایی را که نمی توان در فاصله کمتر از دو ساعت کشت داد می بایست در محیط انتقالی کری بلر قرار داد. ویبریوکلرا در این محیط تا ۶ هفته زنده می ماند.

- ✓ آزمایش مستقیم :

آزمایش مستقیم و میکروسکوپی برای ویبریوکلرا لازم نیست ولی اگر نمونه را در یک قطره معلق از آب پپتونه قلیایی که ۴ تا ۶ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شده است با بزرگ نمایی پائین میکروسکوپ آزمایش کنید حرکت پرشی ( darting) که از مشخصه های

ویبریوکلرا است را می بینید در این حالت اگر آنتی سرم O1 به قطر معلق اضافه کنید و ارگانیسم از حرکت بایستد تا حدودی تشخیص احتمالی ویبریو کلرا ممکن است.

- ✓ کشت:

اگر در کشت تأخیری حادث شود می باید نمونه در محیط انتقالی کری بلیر(cary blair) در یخچال نگهداری شود. برای زمانی اندک می توان آن را در محیط سالین گلیسرول بافره( محیط انتقالی مورد استفاده برای اکثر پاتوژن های روده ای) نگه داری نمود.

ویبریو کلره در pH بالا (۸/۵_۹/۹) در ۳۷ درجه بر روی اکثر محیط های حاوی آسپارژین به عنوان منبع کربن و نیتروژن به خوبی رشد نموده و در pH اسیدی به سرعت کشته می شود. بنابراین باکتری پس از رشد اندک در محیط های حاوی کربوهیدرات سریعا کشته می شوند. برای ایزولاسیون قبل از کشت بر روی محیط جامد می توان از محیط های غنی کننده (enrichment) مانند توروکلات براث و آب پپتونه قلیایی (APW) استفاده نمود. این محیط‌ها باعث غنی کردن باکتری در محیط و بالا رفتن شانس رشد آنها می شود.

اگر APW را نتوان پس از ۶ تا ۸ ساعت گرما گذاری به TCBS منتقل کرد ، تا ۱۸ ساعت صبر کنید و به داخل لوله تازه APW ببرید تا ۶ تا ۸ ساعت گرما گذاری کنید سپس به درون TCBS منتقل کنید. قبل از گزارش منفی محیط TCBS را تا ۴۸ ساعت انکوبه نمائید. چرا که بعضی از کلی فرم ها گونه هایی از پروتئوس و انتروکوک ها نیز ممکن است در روی محیط TCBS رشد کنند. TCBS بر اساس تولید کلنی زرد (تخمیر سوکروز) و کلنی سبز (عدم تخمیر سوکروز) محیط افتراقی برای گونه های ویبریو محسوب می شود. بر روی این محیط ویبریو کلره و ویبریو آلژینولتیکوس با تخمیر سوکروز کلنی زرد رنگ ایجاد می کنند.

TCBS حاوی سیترات سدیم، تیوسولفات سدیم و بایل (املاح صفراوی) است ک ممانعت کننده رشد کوکوس های گرم مثبت و باسیل های گرم منفی که به طور طبیعی در مدفوع وجود دارند می باشد. pH بالا این محیط تسهیل کننده رشد ویبریوها می باشد.

به علت اثر مهاری مواد موجود در TCBS ، نمونه باید به مقدار خیلی زیاد به این محیط تلقیح شود.

- ✓ تست های افتراقی برای موارد جدا شده مشکوک به ویبریوکلرا:

۱- آزمایش اکسیداز :از کلنی های رشد کرده بر روی محیط جامد استفاده کنید. دو تا سه قطره ازمعرف اکسیداز را بر روی کاغذ صافی در ظرف پتری دیش قرار دهید و سپس با یک تکه چوب اپلیکاتور مقداری از کلنی را بر روی کاغذ صافی آغشته شده بمالید واکنش پس از ده ثانیه مشخص می شود. در حالیکه ارگانیسم اکسیداز منفی یا بی رنگ باقی می ماند یا پس از ۱۰ ثانیه به رنگ ارغوانی درمی آید. می‌توان از دیسک‌های اکسیداز نیز استفاده کرد.

۲-آزمون رشته ای String Test

ابتدا سوسپانسیونی از کلنی های رشد کرده روی BHI و یا Blood agar تهیه کنید، سپس دو تا سه قطره از محلول نیم درصد دزاکسی کولات سیترات بر روی سوسپانسیون بریزید در این حالت ویبریو کلرا لیز می گردد و زمانی که لوپ میکروب شناسی را از داخل

سوسپانسیون به طرف بالا حرکت دهید بین لوپ و سوسپانسیون رشته ای تشکیل می گردد که در واقع DNA سلول باکتری لیز شده است.

**به طو خلاصه بررسی نتایج تستهای تشخیصی ویبریو :**

- در تست اکسیداز، نتیجه مثبت می‌شود و رنگ ارغوانی ایجاد می‌شود.
- در تست OF هردو لوله زرد میشوند.
- در پلیت TCBS کلنیهای زرد ایجاد میگردد که به دلیل تخمیر قند سوکروز توسط ویبریو می باشد.
- در محیط TSI واکنش اسید-اسید یعنی کاملا زرد دیده می شود.

## جلسه هشتم: مایکوباکتریوم‌ها

مایکوباکتریوم ها ، باکتری های گرم مثبت هستند که با رنگ آمیزی گرم رنگ نمی گیرند زیرا اسید فست پایدار می باشند و مقاوم به رنگبرها هستند. دیواره سلولی آنها حاوی مقادیر زیاد چربی است و به همین دلیل با روشهای معمول و استفاده از رنگهای آنیلینی در درجهٔ حرارت اتاق رنگ نمی گیرند. در نتیجه با استفاده از افزایش زمان رنگ آمیزی و حرارت ، رنگ آمیزی می شوند و در مقابل عمل بی رنگ کردن با اسید کلریدریک ۳٪ و اتانل ۹۵ ٪ مقاومت می کنند. به این خاصیت اسیدفست یا اسید الکل فست بودن ( Acid Acid alcohol fast / fast) اطلاق می گردد.

این دسته از باکتری ها فاقد کپسول ، اسپور ، فلاژل و پیلی بوده و غیر متحرک هستند. آنها به واسطه ی پوشش سلولی پیچیده که حاوی موم ، گلیکوپروتئین و گلیکولیپید ، مقاومت غیر معمول به شرایط محیطی دارد. اکثر مایکوباکتریوم ها در محیط یافت می شوند ولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم لپره ، به عنوان انگل اجباری مطرح می باشد. به طور کلی مایکوباکتریوم ها عامل بیماری مزمن بوده که دوره ی کمون طولانی دارند. این دسته از باکتری ها هوازی و بی هوازی اختیاری هستند به جز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که هوازی اجباری و مایکوباکتریوم بوویس میکروآئروفیل می باشد. این باکتری در گروه CMNR قرار دارد و دارای ویژگی های این گروه می باشد. این دسته از باکتری ها از باکتری های گرم مثبت پیچیده تر هستند.

بیشتر مایکوباکتریوم هایی که با بیماری های انسانی مرتبطند، برای رشد به محیط های پیچیده حاوی تخم مرغ کامل و یا سرم و ۲ تا ۶ هفته انکوباسیون در درجه حرارت ۳۷-۳۵ نیاز دارند. مایکوباکتریوم لپره عامل بیماری جذام در خارج از هفته انکوباسیون در بدن رشد نمی کند و تا کنون این باکتری در آزمایشگاه کشت داده نشده است.

تشخیص بیماری های ناشی ازمایکوباکتریومها، با نمونه گیری ، انتقال، تهیه گسترش و رنگ آمیزی اختصاص ی از نمونه مشکوک و جداسازی میکرب آغاز می شود. حتی الامکان نمونه ها باید قبل از درمان گرفته و سریعًا به آزمایشگاه منتقل شود. در غیر این صورت حداکثر تا یک شبانه روز می توان آنها را در یخچال نگهداری کرد. به دلیل گستردگی بیماریهایی که عامل آن مایکوباکتریومها هستند، نمونه های مختلفی ممکن است برای تشخیص فرستاده شوند. نمونه هایی که برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و مایکوباکتریومهای غیرسلی (NTM) در بیماری های انسانی فرستاده می شوند عبارتند از: خلط، آسپیره برنش، مایع جنب و و شیره معده.

لازم به توضیح است در مورد کودکانی که مبتلا به سل ریوی اولیه بوده و دارای لزیون های کازئوز محدود هستند و تعداد نسبتًا کمی باسیل دارند، به جای خلط، آزمایش شیره معده توصیه می گردد. شیره معده صبح ناشتا از بیمار گرفته می شود. در بیماران مبتلا به سل دستگاه ادراری ، ادرار اول صبح (حداقل ۱۵ سی سی) گرفته می شود. ادرار ۲۴ ساعته به علت آلودگی قابل قبول نیست. بررسی مدفوع در تشخیص بیماریهای مایکوباکتریال در افراد مبتلا به ایدز و افراد در معرض خطر (High risk) توصیه می گردد. آزمایش خون در بیماران مبتلا به ایدز و بررسی بافت و مایعات بدن مانند مایع مغزی- نخاعی، مایع آسیت و ... در مواردی کمک کننده است.

از آنجا که کشت سنتی مایکوباکتریوم‌های بیماری زا بسیرا طولانی می‌باشد (۲ تا ۶ هفته)، تکنیکهای سریع شامل سیستم رادیومتریک کالچر (BACTEC) برای جداسازی، تست حساسیت و تشخیص اولیه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس از سایر مایکوباکتریومهای ساپروفیت می‌توانند مفید باشند.

معمول ترین ترین راه تشخیص پاراکلینیکی ، آزمایش مستقیم نمونه بالینی و کشت برروی محیطهای مصنوعی است. اگر چه حساسیت آزمایش مستقیم در تشخیص کمتر از کشت است و کشت به عنوان استاندارد طلایی تشخیص مایکوباکتریومی مطرح می‌باشد، ولی آزمایش مستقیم اطلاعات اولیه را در اختیار پزشک قرار می دهد.

## آزمایش میکروسکوپی

مطالعه میکروسکوپی گسترش پس از رنگ آمیزی اسیدفست، روشی ساده و سریع است. مایکوباکتریومها یکنواخت رنگ نمی گیرند و منظرهٔ دانه دار پیدا می کنند. رنگ آمیزی اسیدفست برپایهٔ بالا بودن محتویات چربی دیوارهٔ سلولی و مقاومتشان به اسید والکل است. روشهای متداول اسیدفست عبارتند از : زیل نلسون و کینیون که از کربول فوشین به عنوان رنگ اصلی، اسید الکل به عنوان مایع رنگ بر و متیلن بلو به عنوان رنگ زمینه استفاده می شود. در روش زیل نلسون از حرارت استفاده می شود، در حالیکه در روش کینیون که فوشین سرد نیز نامیده می شود، از حرارت بهره نمی گیرند ( ۲۰ دقیقه رنگ امیزی). استفاده از رنگهای فلورسنت اورامین و ردامین برای بررسی اولیه گسترش توصیه شده است . در این روش باسیلها در زمینه تاریک به صورت زرد نارنجی و درخشان دیده می شوند.

## رنگ آمیزی زیل نلسون (Ziehl- Neelsen)

۱. گسترش تهیه شده را با حرارت ثابت کنید.
۲. محلول کربول فوشین را روی گسترش ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده، بطوریکه بخار متصاعد شود ولی نجوشد و خشک نشود. به محض تبخیر رنگ ، فوشین تازه به نمونه اضافه شود. (در روش کینیون از حرارت استفاده نمی شود ولی رنگ فوشین به مدت ۱۵ دقیقه برروی اسلاید می ماند.)
۳. اسلاید را با آب بشوئید.
۴. گسترش را با محلول اسید و الکل بی رنگ نمائید. در این مرحله به پشت و روی اسلاید توجه نمایید.
۵. اسلاید را با آب بشوئید.
۶. روی اسلاید متیلن بلو ریخته و ۴ دقیقه صبرکنید.
۷. اسلاید را با آب بشوئید.
۸. اسلاید را خشک کرده و یک قطره روغن سدر روی گسترش گذاشته و با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ مطالعه نمائید . باسیلهای اسید فست به رنگ قرمز در زمینه آبی دیده می شوند.

## کشت مایکو باکتریوم ها

برای کشت اغلب از محیط اختصاصی لونشتاین جانسون (Lowenstein Jensen, LJ) استفاده می شود. این محیط دارای تخم مرغ، گلیسرول، عصاره سیب زمینی، نمک ، آسپارژین و مالاشیت گرین است. مایکوباکتریومها به ترکیبات سمی حاصل از متابولیسم حساس می باشند و وجود نشاسته، گلیسرول و تخم مرغ موجب سم زدایی محیط گشته و همچنین برخی از مواد غذایی ضروری رشد را فراهم می کنند. مالاشیت گرین نیز رشد باکتریهای آلوده کننده را متوقف می کند پس به عنوان یک عامل انتخابی کردن محیط برای مایکوباتریوم‌ها عمل میکند. وجود این مهار کننده به دلیل اینکه معمولا نمونه‌های گرفته شده دارای آلودگی با دیگر باکتری‌ها بود وهمچنین مدت زمان رشد باکتری بسیار طولانی است، مهم و حیاتی است. افزودن آسپارژین به محیط نیز موجب حداکثر تولید نیاسین توسط برخی مایکوباکتریومها می گردد. عامل سل انسانی شدیدًا هوازی و کند رشد می باشد (زمان تکثیر یک سلول مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۱۸ ساعت است) و حدود یک تا دو ماه طول می کشد تا باکتری رشد کند و دراین مدت از کلنی حاصل، گسترش تهیه و به جستجوی مایکوباکتریوم می پردازند.

مرفولوژی کلنی، سرعت رشد، حرارت اپتیمم و واکنش به نور، خصوصیات فنوتیپیکی هستند که به جداسازی این باکتریها کمک می کند.

افتراق انواع مایکوباکتریومها براساس ویژگیهای زیر انجام می شود؛

مرفولوژی کلنی (نوع S یا R)، محدوده حرارتی رشد، سرعت رشد (سریع یا آهسته )، پیگمان (فوتو، اسکوتو، غیرکروموژن)، آریل سولفاتاز، منبع کربن، کاتالاز، جذب آهن ، نیاسین ، احیای نیترات ، پیرازین آمیداز، رشد در ۵ درصدکلرورسدیم، احیای تلوریت ، تولید اوره آز و ...مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بویس (عوامل سل انسانی و گاوی) کلنی های کوچک، کرم رنگ، خشک و خشن دارند که تدریجًا بزرگ شده و بهم می چسبند.

به دلیل وجود موادی چون موکوس یا مواد آلی در نمونه های بالینی بخصوص خلط و نیز فراوانی سایر ارگانیزم‌های سریع الرشد و آلودگی، جداسازی مایکوباکتریومها تحت تاثیر قرار می گیرد. به هم ین دلیل از روش هضم و آلودگی زدایی به ترتیب زیر استفاده می شود، سیال نمودن نمونه از طریق هضم مواد موکوسی و از بین بردن ارگانیزمهای غیر مایکوباکتریومی در زمان تماس با مواد شیمیایی و

آلودگی زدا. عمل هضم و سیال شدن نمونه به تغلیظ باکتریها کمک کرده و تماس باکتریها را با مواد غذایی محیط امکانپذیر می سازد. مقدار بالای چربی موجود در دیوارهٔ سلولی مایکوباکتریوم، موجب مقاومت آنها در برابر عمل کشندگی مواد شیمیایی می گردد. نمونه هایی که از بافتهای عمقی و یا از قسمتهای استریل برداشت می شوند مانند مایع مغزی نخاعی یا مایع مفصلی نیاز به آلودگی زدایی ندارند ولی نمونه هایی مانند خلط، شیره معده، مایع آسیت ، ادرار، بافتهای آلوده و ... نیاز به آلودگی زدایی دارند.

برای عمل هضم و آلودگی زدایی می توان از مواد و محلولهای مختلفی بهره جست که معمول ترین آنها سود ۴-۳ درصد و یا ترکیب ان استیل ال سیستئن- سدیم هیدروکسید (NALC–NaOH) می‌باشد. بعد از عمل هضم و آلودگی زدایی ، نمونه ها را سانتریفوژ کرده و از رسوب حاصل گسترش تهیه کرده و برروی محیط مخصوص نیز کشت می دهند.

شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توسط روش‌های فنوتیپی به علت رشد آهسته باکتری بسیار زمان بر و پرزحمت می باشد. در سال های اخیر استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR و سکوانسینگ برای شناسایی سریع و اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توسعه یافته است.

### محیط های رایج برای کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

| محیط | اجزا | عوامل مهارکننده |
|---|---|---|
| **لونشتین- جانسون** | تخم مرغ ، نمک، گلیسرول، سیب زمینی | مالاشیت گرین |
| **میدل بروک 7H10** | نمک، ویتامین، کوفاکتور، اولئیک اسید، آلبومین، کاتالاز، گلیسرول، گلوکز | مالاشیت گرین |
| **میدل بروک 7H11** | نمک، ویتامین، کوفاکتور، اولئیک اسید، آلبومین، کاتالاز، گلیسرول، ۰,۱٪ کازئین هیدرولیزات | مالاشیت گرین |
| **7H9و 7H12میدل بروک** | پایه مایع، کازئین هیدرولیزات، سرم آلبومین گاوی، کاتالاز، پالمتیک اسید، آب مقطر | پلی میکسین B، آمفوتریسین B، نالیدیکسیک اسید، تری متوپریم، آزلوسیلین |

## جلسه نهم: کشت خون

### تعاریفa و اصطلاحات:

باکتریمی ( Bacteremia): به تنها حضور باکتری در خون اطلاق می‌شود.

سپتیسمی (Septicemia): به حضور باکتری در خون همراه با تکثیر و تقسیم آن در خون اطلاق می‌شود.

فونگمی (Fungemia): به حضور قارچ‌ها یا مخمرها در خون اطلاق می‌شود.

سپسیس(Sepsis): به هرگونه عفونت خون اطلاق می‌شود.

میزان بروز سپسیس در سراسر جهان دارای ابتلا و مرگ و میر در حال افزایشی است. آشکارسازی سریع و دقیق باکتریمی و فونگمی برای بهبود وضعیت بیمارضروری است. مراقبین بهداشتی، پرستاران و احتمالاً بسیاری از کارکنان آزمایشگاهی آموزش لازم و کافی در تکنیک‌های صحیح کشت خون را فرا نگرفته‌اند. رهنمود حاضر به اهمیت کلینیکی کشت خون، موارد کاربرد آن و تکنیک صحیح در زمینه‌ی تشخیص میکروارگانیسم‌های پاتوژنی که موجب سپسیس می‌شوند می‌پردازد و سعی دارد که جایگاه کشت خون در مدیریت سپسیس را توضیح داده و روش مناسب برای بدست آوردن نمونه‌ی خون جهت کشت آن برای کاهش موارد مثبت کاذب را شرح دهد.

مسئله آلودگی کشت خون :

از دیرباز پزشکان و میکروبیولوژیست‌ها به اهمیت کشت خون بعنوان یکی از مهم‌ترین تست‌های آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری‌های مهلک پی برده بودند. در سال‌های اخیر مشخص شده که کشت‌های خون آلوده شده (ورود و حضور یک پاتوژن از خارج از جریان خون) که منجر به نتایج مثبت کاذب می‌شوند شایع هستند. کشت‌های خون آلوده شده حدود نصف و یا بیشتر از نیمی از موارد تمام کشت‌های خون مثبت را در بعضی مراکز به خود اختصاص می‌دهند و این مسئله موجب تحمیل هزینه‌های بسیار سنگین هم برای بیماران و نیز سیستم مراقبت بهداشتی و درمانی شده و همچنین باعث سردرگمی برای کلینیسین‌ها شده است.

دلائل متعددی وجود دارد که چرا کشت‌های خون غالباً آلوده می‌شوند؛ احتمالاً مهم‌ترین فاکتور مربوط به نحوه‌ی نمونه‌گیری است که پرستار یا نمونه‌گیر از تکنیک مناسب آسپتیک استفاده نمی‌کند. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که فلبوتومیست‌های آموزش‌دیده و یا تیم‌های کشت خون نسبت به سایرین دارای میزان کمتری از کشت‌های خون آلوده هستند.

فاکتور دوم مربوط به ماده‌ی آسپتیک به‌تنهائی است، تنتور ید و کلرهگزیدین گلوکونات (chlorhexidine gluconate) برای استریلیزاسیون پوست نسبت به یدوفورها مثل پوویدون ایوداین(povidone iodine) یا همان بتادین بسیار مؤثرتر هستند.

فاکتور سوم طریقه فراهم کردن نمونه‌ی خون برای کشت است. در سالیان اخیر تمایلی برای بدست آوردن نمونه از طریق کاتترهای داخل رگی و یا از طریق دستگاه‌های دیگر مثل پورت‌ها پدید آمده و کشت‌های خون بدست آمده از این طریق بیشتر از نمونه‌هائی که از طریق خونگیری از عروق محیطی صورت گرفته آلودگی نشان داده‌اند. چهارمین علت سیستم‌های کشت خون مدرن و محیط‌های کشتی است که در آنها از رزین‌های باند شده به آنتی‌بیوتیک و یا ذغال فعال استفاده می‌کنند. این سیستم‌ها همانطور که پاتوژن‌های بیشتری را آشکار می‌کنند از طرف دیگر موارد نشان دادن استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی را بعنوان شایع‌ترین آلوده‌کننده‌ی کشت خون افزایش داده‌اند.

## رهنمودهای مربوط به تفسیر و تعبیر کشت‌های خون مثبت

برخی از ابزارهای کلینیکی و آزمایشگاهی می‌توانند به پزشکان و میکروبیولوژیست‌ها کمک کنند تا تصمیم بگیرند که یک ایزوله‌ی خونی آیا پاتوژن است و یا صرفاً یک آلوده کننده است. بصورت واضح و آشکاری حضور فاکتورهای مستعدکننده در بیمار و وجود یک حالت پایدار کلینیکی می‌تواند به پزشکان در تفسیر نتایج تست کمک کنند. هویت میکروارگانیسم نیز اطلاعات مهمی را فراهم می‌کند. میکروارگانیسم‌هائی که همیشه و یا تقریباً همیشه (یعنی بیشتر و یا برابر ۹۰درصد موارد) وقتی از خون جدا شوند، عفونت حقیقی را نشان می‌دهند شامل استافیلوکوک اورئوس، استرپتوکوک پیوژن، استرپتوکوک آگالاکتیه، استرپتوکوک پنمونیه، اشریشیا کولی و دیگر اعضاء خانواده‌ی آنتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های کاندیدا هستند. در مقابل استافیلوکوک کوآگولاز منفی، گونه‌های کورینه باکتریوم، گونه‌های باسیلوس غیر از آنتراسیس و پروپیونی باکتریوم آکنه معمولاً نمایانگر آلودگی هستند. جدا کردن این ارگانیسم‌ها و بطور عمده استافیلوکوک کوآگولاز منفی و نیز کورینه باکتریوم‌ها ممکن است موجب سردرگمی برای کلینیسین‌ها شوند. گونه‌های کورینه باکتریوم بخشی از فلور نرمال پوست انسان هستند و بنابراین نوعاً بیماری تهاجمی حقیقی را بوجود نمی‌آورند، اما کورینه باکتریوم در حضور دستگاه‌های پزشکی مثل پروتزهای مفصلی، کاتترها، پورت‌ها، گرافت‌های عروقی، دریچه‌های مصنوعی قلب و باطری (پیس میکر) می‌تواند عفونت‌های قابل توجهی را به لحاظ کلینیکال موجب شود. در عفونت‌های داخل عروقی و دیگر عفونت‌های جریان خون همه یا اکثر کشت‌های خون که در زمان تشخیص بیماری بدست می‌آیند مثبت هستند در صورتیکه اگر کشت خون آلوده باشد (مثبت کاذب) معمولاً فقط یکی از چند نوبت کشت خونی که گرفته می‌شود مثبت خواهد بود. بسیاری از مراکز بیمارستانی دارای میزان‌های آلودگی در طیف ۳٪ کشت‌های خون بدست آمده هستند. اگر دو نمونه کشت خون تهیه شود و هر دو نمونه مثبت باشد حتی اگر با میکروارگانیسمی که معمولاً بعنوان آلوده کننده در نظر گرفته می‌شود، در این‌صورت بیانگر یک بیماری واقعی است.

## کاهش بار آلودگی

آلودگی کشت خون را بطور کامل نمی‌توان تخمین زد اما این امکان برای مؤسسات و بیمارستان‌ها وجود دارد که میزان موارد آلودگی را کاهش دهند. یک مرحله این است که از مواد آنتی سپتیک مؤثرتر استفاده شود. محلول‌های پوویدون آیوداین (یدوفورها) نیاز به یک و نیم الی دو دقیقه زمان تماس دارند تا حداکثر اثرات آنتی‌سپتیکی خود را باقی بگذارند در حالی‌که تنتور ید و کلرهگزیدین گلوکونات به فقط ۳۰ ثانیه زمان تماس نیاز دارند. بسیاری از پرستاران یا فلبوتومیست‌ها که کشت خون تهیه می‌کنند در حال عجله هستند و به زمان تماس آنتی‌سپتیک توجه ندارند و اهمیت آن را نمی‌دانند و تمایلی ندارند که تا ۲ دقیقه صبر کنند و بعد اقدام به نمونه‌گیری کنند. مؤسسه استانداردهای کلینیکی و آزمایشگاهی(CLSI)که رهنمودهائی را بر پایه بهترین داده‌های در دسترس تهیه می‌کند، تنتور ید، کلرین پراکساید و کلرهگزیدین گلوکونات را توصیه می‌کند و نیز ابراز می‌دارد که تنتور ید و کلرهگزیدین گلوکونات احتمالاً دارای اثرات برابری هستند.

مراکز بیمارستانی می‌توانند با بکارگیری فلبوتومیست‌های آموزش‌دیده و یا با تشکیل تیم‌های ویژه کشت خون و صرفاً استفاده از آنها برای نمونه‌گیری کشت خون، بعوض استفاده اتفاقی از پرسنل آزمایشگاه، دستیاران پرستاری بدون مدرک، دانشجویان پزشکی و

رزیدنت‌ها، میزان‌های آلودگی کشت خون را کاهش دهند. فلبوتومیست‌های آموزش‌دیده‌ی آزمایشگاهی و تیم‌های کشت خون را بهتر می‌توان آموزش داد و آنان را روی تکنیک‌های صحیح آنتی‌سپتیک متمرکز نمود. علاوه بر این‌ها می‌توان بعنوان بخشی از برنامه بهبود اجرائی آن مؤسسه یا مرکز بیمارستانی میزان‌های آلودگی کشت خون را همواره پایش نمود. بدلیل اینکه تقریباً نیمی از تمام موارد کشت‌های خون در اکثر مراکز آلودگی را نشان می‌دهند آزمایشگاه‌ها باید سیاست‌ها و خط مشی‌هائی را برنامه‌ریزی کنند که احتمال آلودگی‌ها را هرچه محدودتر کنند. بعنوان مثال اگر فقط در یک نوبت کشت خون "استافیلوکوک کوآگولاز منفی، گونه‌های باسیلوس، کورینه باکتریوم، پروپیونی باکتریوم، گروه استرپتوکوک ویریدنس، گونه‌های میکروکوک یا آئروکوک"رشد کند، احتمال آلودگی بالا است و لازم نیست که شناسائی کامل میکروارگانیسم جدا شده و تست تعیین حساسیت باکتریائی انجام بگیرد مگر آنکه یک رابطه‌ی مستقیم بین پزشک معالج بیمار و مسئول آزمایشگاه وجود داشته باشد که در اینصورت با در نظر گرفتن وضعیت کلینیکی بیمار این میکروارگانیسم‌ها ممکن است بصورت پاتوژن‌های قابل توجهی خود را نشان داده باشند.

**نکات مهم**

۱- آلودگی کشت خون مسئله‌ی شایعی است و در برخی از مراکز تا ۵۰٪ کشت‌های خون ممکن است آلودگی داشته باشند.

۲- شناسائی ارگانیسم‌های جدا شده در تعیین اینکه کشت خون آلوده شده است یا خیر می‌تواند کمک‌کننده باشد زیرا برخی ارگانیسم‌ها بندرت ایجاد عفونت‌های خونی می‌نمایند.

۳- تعداد کشت‌های خون که ارگانیسم خاصی از آن جدا می‌شود می‌تواند در ارزیابی عفونت واقعی کمک کند. بعنوان مثال اگر ۲ نمونه کشت خون که بصورت جداگانه از ۲ محل مختلف در یک زمان بدست آمده باشند و هر دو یک ارگانیسم را نشان دهند، در این حالت احتمال آلودگی کمتر از یک در هزار خواهد بود.

۴- مراکز بیمارستانی می‌توانند با استفاده از عوامل آنتی‌سپتیک بسیار مؤثر و بکارگیری پرسنل آموزش‌دیده و ویژه برای تهیه کشت خون میزان آلودگی را کاهش دهن

نوع نمونه قابل اندازه گیری: خون کامل

حجم نمونه مورد نیاز: حجم خون دریافتی جهت کشت بر حسب سن متفاوت می باشد.

بزرگسالان: ۱۰-۲۰ ml کودکان: ۲-۶ ml نوزادان: ۱-۳ ml

**شرایط نمونه گیری:**

۱.ئنیاز به ناشتایی یا آمادگی خاصی نمی باشد.

۲. عمل خونگیری بایستی قبل از تجویز آنتی بیوتیک انجام شود و بهترین زمان خونگیری نیز هنگام شروع افزایش تب می باشد.

**ملاحظات نمونه گیری:**

۱. نمونه گیر جهت خون گیری ملزم به پوشیدن دستکش می باشد. از آنجا که نمونه خون برای کشت می بایست در شرایط استریل گرفته شود، رعایت این نکته حائز اهمیت است که هر سطح آلوده ای که با مکان ضدعفونی شده خون گیری در تماس است نیز ضدعفونی گردد.

۲. برای ضد عفونی کردن پوست جهت خونگیری ابتدا از الکل (اتانول) ۷۰ درصد و سپس از بتادین (پویدون آیودین) با غلظت ۲٪ می توان استفاده کرد. یا اینکه می توان محلول ایزوپروپیل الکل ۷۰٪ در یدور ۱٪ بکار برد.

۳. محل خونگیری وریدی را با بتادین بدقت تمیز نمایید و بگذارید تا پوست خشک شود.

۴. محیط کشت با سرلوله های حاوی خلأ (وکیوتینر) یا بطری های کشت را با محلول بتادین تمیز کنید و بگذارید تا خشک شوند. بعضی از آزمایشگاه ها پیشنهاد می کنند پس از تمیز کردن با بتادین و خشک شدن در هوا، با الکل ۷۰٪ نیز تمییز گردد.

۵. با یک سوزن ۲۰ میلی لیتری، در حدود ۱۰-۲۰ ml خون وریدی از محل نمونه گیری بگیرید.

۶. پس از نمونه گیری سر سوزن سرنگ را دور بیاندازید و پیش از تزریق نمونه خون به درون بطری کشت، سرسوزن استریل دوم را جایگزین نمایید.

۷. چنانچه کشت هوازی و بی هوازی مورد نیاز باشد، ابتدا نمونه را به بطری بی هوازی تلقیح نمایید. پس از تلقیح به آرامی مخلوط کنید.

۸. بر روی نمونه، نام بیمار، تاریخ، زمان و تشخیص های احتمالی را برچسب بزنید.

۹. بطری های کشت را بلافاصله یا حداقل ظرف مدت ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه منتقل نمایید.

۱۰. مصرف هر گونه داروی مؤثر بر نتایج آزمون را روی برگه آزمایشگاه ذکر نمایید.

۱۱. در مواردی که عامل تب مشخص است (پنومونی، منتژیت و ...) دو کشت خون از دو بازو همزمان گرفته می شود و در ارزیابی تب با علت ناشناخته، سه کشت خون از سه محل آناتومیک مختلف با فاصله زمانی ۴۵ تا ۶۰ دقیقه ای گرفته می شود.

## موارد عدم پذیرش نمونه:

- نمونه ای که بیش از ۴۸ ساعت از زمان جمع آوری آن گذشته باشد و کشت داده نشود
- نمونه خونی که در محیط انتقالی مناسبی قرار نگرفته باشد
- نمونه با برچسب (مشخصات) نادرست
- حجم ناکافی نمونه
- آلودگی های محیطی
- نمونه ای که پس از نمونه گیری در یخچال یا فریزر نگاهداری شود.

اگر نمونه ای غیرقابل قبول رسیده باشد، قبل از اینکه نمونه دور ریخته شود به پزشک یا ایستگاه پرستاری اطلاع داده می شود و نمونه ی دیگری درخواست می گردد.

## محیط های کشت خون

به دلیل تنوع باکتری هایی که از خون جدا می شوند به محیط های کشت متعددی نیاز است تا امکان رشد باکتری ها را افزایش دهند. محیط های کشت خون پایه حاوی نوترینت براث و یک ماده ضد انعقاد می باشند. محیط های کشت مایع با فرمول های متفاوت وجود دارند، چه انهایی که می توانند در آزمایشگاه ها آماده شوند و چه آنهایی که به طور تجاری در دسترس می باشند. متداول ترین بطری های کشت که به صورت تجاری در دسترس هستند عبارتند از:Trypticase soy broth، Brain-Heart infusion broth، Thioglycolate broth و پپتون مایع به همراه مواد افزودنی نظیر سوکروز، مانیتول و یا سوربوز. محیط های کشت مایع اختصاصی تر نیز از قبیل کلمبیا براث و بروسلا براث وجود دارند.

مواد ضد انعقاد: خون گرفته شده برای کشت نباید منعقد گردد. اگر باکتری ها در میان لخته های خون به دام افتاده باشند، چه بسا حضور آنها از نظر پنهان بماند. هپارین، EDTA و سیترات، رشد بسیاری از اُرگانیسم ها را مهار می کنند؛ از این رو از آنها استفاده نمی گردد.سدیم پلی آنتول سولفونات (SPS) در غلظت های ۰,۰۲۵ تا ۰,۰۳ بهترین ماده ضد انعقاد برای خون بشمار می رود. SPS به عنوان یک ترکیب ضد کمپلمان و ضد فاگوسیتوز نیز مطرح بوده و با فعالیت ضد میکروبی برخی عوامل، بویژه آمینوگلیکوزیدها مقابله می کند. با این وجود SPS اثر مهارکنندگی بر رشد باکتری هایی چون نایسریاها، گاردنلا واژینالیس و پپتواستریتوکوکوس دارد ولی افزودن ۱,۲ ٪ ژلاتین این اثر را از بین می برد. ماده ضد انعقاد سدیم آمیل سولفات (SAS) عملکردی مشابه SPS دارد، ولی از رشد کلبسیلا پنومونیه جلوگیری می کند.

## شرایط انکوباسیون

اغلب باکتریها برای رشد در آزمایشگاه نیاز به حدود ۲۴ ساعت وقت دارند و گزارش مقدماتی نیز همین زمان آماده خواهد شد. معمولا ۴۸ تا ۷۲ ساعت زمان برای رشد و شناسایی ارگانیسم لازم است. رشد ارگانیسم های هوازی ممکن است بیشتر به طول انجامد. احتمال دارد پس از درمان آنتی بیوتیکی نیز جهت اطمینان از برطرف شدن عفونت، کشت تکرار گردد.

نمونه کشت را در یخچال یا فریزر نگهداری ننمایید. نمونه کشت را در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری نمایید. بسته به نوع باکتری مدت زمان انکوباسیون متفاوت است. برای مثال باکتریهای بی هوازی را تا دوهفته و باکتری بروسلا را تا ۳ هفته نگهداری می کنند.

## کاربردهای بالینی

۱. تشخیص علت عفونت باکتریایی یا قارچی در خون.

۲. تشخیص و افتراق باکتریمی موقت از دائم؛

مهمترین عامل باکتریمی موقت دستکاری بافت های عفونی مانند برداشتن لوزه ها، عمل جراحی در نواحی غیر استریل بدن، جراحی دندان، سوند گذاری در مجاری ادراری تناسلی و آبسه ها می باشد.

باکتریمی دائمی یا مستمر در موارد تب تیفوئید، تب مالت، لپتوسپیروزیس، عفونتهای درون عروقی و اندوکاردیت دیده می شود.

یافته های طبیعی: عدم رشد میکروارگانیسم پاتوژن در کشت خون

روش مرجع: کشت خون

سایر روش ها: روش های سرولوژی و آزمون های تکثیر مولکولی.

تفسیر: برای کشت های معمولی خون از محیط های منوفازیک و در مورد بروسلا از محیط های دی فازیک ( به منظور عدم ساب کالچر مکرر و کمک به جداسازی میکروارگانیسم) استفاده می شود. پس از عمل تلقیح بطریهای کشت خون به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می شود و از نظر کدورت بررسی و هر روز حداقل یکبار در محیط های روتین از جمله بلاد آگار، شکلات آگار، مک کانکی، ساب کالچر می کنیم. در صورت منفی بودن کشت بایستی تا یک هفته بطری کشت خون به همین طریق مورد بررسی قرار گیرند. اگر هدف از کشت خون بررسی باکتریهای بی هوازی باشد بایستی بطری کشت خون مدت ۲ هفته نگهداری شود. و در مورد میکروب بروسلا زمان نگهداری ۳ هفته می باشد. از آنجا که برخی از باکتریها مانند پنوموکوک و هموفیلوس علائم رشد را نشان نمی دهند بهتر است صرف نظر از بوجود آمدن علائم رشد ۱۲-۶ ساعت پس از تلقیح بر روی محیط شکلات آگار در حضور $CO_2$ ساب کالچر انجام شود. در مواردی که هدف از کشت خون بررسی پسودوموناس یا وجود قارچها باشد بهتر است جهت کمک به جداسازی عوامل فوق توسط سوزن های فیلتردار به محیط کشت خون هوا رسانده شود. در صورت مشاهده علائمی چون کدورت محیط کشت، رسوب فولیکولار ته بطری به همراه تجمع RBC یا لایه بافی کت، همولیز مایه رویی، تشکیل دانه های سفید رنگ در سطح و عمق محیط کشت ویا تولید گاز، از محیط کشت خون اسمیر تهیه نموده و به دو روش گرم وگیمسا رنگ آمیزی و بر اساس مرفولوژی در محیط های کشت بلاد آگار، شکلات آگار، مک کانکی، ساب کالچر می کنیم. اگر بطری کشت خون علائم رشد را نشان نداد تا یک هفته نگهداری و معمولاً بعد از یک هفته گزارش می شود. به طور استاندارد کشت خون برای باکتری های بی هوازی و هوازی بیهوازی اختیاری بکار می رود. همه باکتری ها می توانند از کشت خون جدا شوند. در برخی موارد عفونت خون به صورت پلی میکروبیال می باشد که معمولاً یک باکتری هوازی با یک باکتری بی هوازی عامل عفونت هستند. امروزه محیط های حاوی رزین که اغلب آنتی بیوتیک ها را به طور غیر انتخابی با جذب آنها در سطح دانه های رزین غیر فعال می کنند، در دسترس می باشند. محیط های حاوی رزین شانس جدا کردن استافیلوکوک ها را افزایش می دهند. از جمله محیط های حاوی رزین می توان به سیستم کشت خون مدرن BACTEC اشاره کرد که حاوی کربن ۱۴ (C14) می باشد. باکتری با مصرف کربن ۱۴ از نظر منبع $CO_2$ تامین می شود. این سیستم در کشت گونه های مایکوباکتریوم و لژیونلا مورد استفاده قرار می گیرد. علاوه بر محیط های کشت حاوی رزین، سیستم BACT/ALERT شامل بطری های کشت خونی است که در آن از محیط مایع BHI حاوی ذرات ذغال فعال، به عنوان مکمل، استفاده شده و به طور چشمگیری رشد میکروارگانیسم ها را فراتر از محیط های کشت استاندارد افزایش می دهد.

## محدودیت ها و عوامل مداخله گر

- مهم ترین عامل در ایجاد آلودگی در کشت خون ضد عفونی کردن نادرست پوست می باشد. حتی در شرایطی که ضد عفونی کردن محل خونگیری به خوبی انجام شده باشد در ۵ – ۳ درصد موارد آلودگی مشاهده می شود. آلودگی ممکن است توسط آلوده کننده های پوستی مثل استافیلوکوک اپیدرمیدیس، دیفتروئید، گونه های کلستریدیوم و باسیلوس (به استثناء باسیلوس آنتراسیس) و آسینتوباکتر باشد. این باکتری ها به ندرت می توانند پاتوژن تلقی شوند.
- در صورت عدم استفاده از ماده ضد انعقاد، باکتریها در لخته به دام می افتند و از آنجایی که در لخته فعالیت فاگوسیتوز زیاد است کشت خون منفی می شود.
- استفاده از مواد ضد انعقاد نامناسب مانند سیترات سدیم یا EDTA از رشد باکتری ها از جمله کوکسی های گرم مثبت جلوگیری می کند.
- مصرف آنتی بیوتیکها پیش از انجام آزمایش ممکن است سبب تغییر نتایج آزمایش گردد.
- هرگونه نتیجه مثبت را به پزشک اطلاع دهید تا درمان آنتی بیوتیکی یا ضد قارچی مقتضی آغاز گردد.
- تمام نتایج کشت اعم از پاتوژن یا آلودگی باید به پزشک گزارش شود.

## توضیحات

• جداسازی میکروارگانیسم ها از خون توسط آزمایشگاه به عوامل متعدد و اغلب پیچیده ای از قبیل نوع باکتریمی، روش های جمع آوری نمونه، حجم خون مورد آزمایش، زمان و دفعات کشت خون، تفسیر نتایج و بیمار مورد پذیرش آزمایشگاه بستگی دارد. چنانچه هر یک از این موارد در تدوین دستورالعمل های کشت خون، مورد توجه آزمایشگاه قرار نگیرد، چه بسا جداسازی و تشخیص میکروارگانیسم ها با چالشی جدی مواجه گردد.

• شایع تری ارگانیسم های جدا شده از خون، کوکسی های گرم مثبت شامل استافیلوکوک های کواگولاز منفی، استافیلوکوکوس ارئوس، گونه های انتروکوک و نیز سایرارگانیسم هایی هستند که احتمالاً ساکن محیط های بیمارستانی بوده و قادرند روی پوست یا ناحیه اروفارنکس و دستگاه گوارش بیماران استقرار یابند.

• حضور قارچ ها در خون (فانگمی) حکایت از یک وضعیت بحرانی داشته که اساساً در بیمارانی که سیستم ایمنی آنها سرکوب شده و یا مبتلا به یک بیماری شدید هستند، اتفاق می افتد. ارگانیسمی که به مراتب بیشتر از سایر گونه ها جدا می شود کاندیدا آلبیکنس است؛ هر چند اغلب، مالاسزیا فورفور نیز به ویژه در نوزادانی که مکمل های لیپیدی را به طور تزریقی در رژیم غذایی خود دریافت می کنند، قابل جداسازی است. گونه های کاندیدا مسؤول حدود ۸ تا ۱۰ درصد عفونت های خون اکتسابی از بیمارستان می باشند.

• به جز هیستوپلاسما که در گلبول های سفید تکثیر می یابد، سایر قارچ ها سلول های خونی را مورد تهاجم قرار نمی دهند اما حضور آنها در خون معمولاً نشانگر کانونی از عفونت در نقطه ای دیگر از بدن است.

• عفونت خون به دو گروه اصلی تقسیم می شوند: درون عروقی ( آنهایی که از درون سیستم قلبی – عروقی منشاء می گیرند) و برون عروقی ( آنهایی که حاصل ورود باکتری ها به گردش خون از طریق سیستم لنفاوی بوده و مربوط به سایر مناطق آلوده بدن می باشند).

• عواملی که زمینه را برای آغاز عفونت خون مساعد می سازند عبارتند از عوامل سرکوب کننده سیستم ایمنی، استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف که با از بین بردن فلور نرمال، باعث پدیدار شدن سویه های مقاوم می گردند، روش های تهاجمی که امکان دست یابی باکتری ها به محیط داخلی بدن میزبان را فراهم می کنند، روش های پیشرفته جراحی و افزایش طول عمر بیماران مبتلا به بیماری های سخت و تضعیف کننده.

• عفونت های درون عروقی شامل اندوکاردیت عفونی، آنوریسم مایکوتیک یا اتساع قارچ گونه یا تکمه ای شکل (Ω) عروق خونی، ترومبوفلبیت چرکی و نیز باکتریمی ناشی از کاتترهای درون وریدی می باشند. از آنجا که منشاء چنین عفونت هایی واقع در درون رگها می باشد، ارگانیسم ها به میزان نسبتاً ثابتی به جریان خون راه می یابند (باکتریمی مستمر). چنین عفونت هایی در سیستم قلبی – عروقی کاملاً جدی بوده و تهدید کننده حیات به شمار می روند.

• استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ارئوس شایع ترین عوامل اندوکاردیت دریچه های مصنوعی قلبی می باشند. دریچه های قلبی به خصوص آنهایی که قبلاً دچار آسیب شده اند سطوح مناسبی را برای اتصال این باکتری ها فراهم می سازند.

• سویه های خاصی از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس تمایل ویژه ای برای ایجاد عفونت ناشی از کاتترهای وریدی دارند؛ این امر به واسطه توانایی آنها در تولید مجموعه پیچیده ای از قندها (پلی ساکاریدها) می باشد که به ارگانیسم کمک می نماید تا به سطح کاتتر اتصال یابد. کاتتر های وریدی از ملزومات مراقبتی برای بیماران بستری در بیمارستان محسوب می گردند.

• باکتریمی کسب شده از بیمارستان (بیماران بستری در بیمارستان پس از سپری شدن ۷۲ ساعت از زمان بستری شدن) معمولاً توسط اُرگانیسم های مقاومی نظیر سودوموناس آئروژینوزا و گونه های اتتروکوک که بتالاکتاماز و سایر فاکتورهای مقاومت را دارند ایجاد می گردد.

• در عفونت های خارج خارج عروقی بر خلاف عفونت درون عروقی، باکتری ها معمولاً از طریق سیستم لنفاوی به گردش خون راه می یابند. اکثر موارد باکتریمی با ارزش از نظر بالینی، حاصل عفونت هایی با منشاء خارج عروقی هستند.

• شایع ترین راه های ورود ارگانیسم ها برای ایجاد باکتریمی عبارتند از: دستگاه تناسلی- ادراری (۲۵٪)، دستگاه تنفسی(۲۰٪)، آبسه ها(۱۰٪)، عفونت زخم های جراحی(۵٪)، سیستم صفراوی(۵٪)، سایر مکان ها(۱۰٪) و راه های نامشخص(۲۵٪). در اکثر موارد، احتمال وقوع باکتریمی از یک منشاء خارج عروقی به عواملی چون مکان عفونت، شدت عفونت و ارگانیسم عامل آن ارتباط دارد.

**مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت های خونی (سپسیس)**

| اُرگانیسم های گرم منفی | اُرگانیسم های گرم مثبت و قارچها |
|---|---|
| اشریشیا کلی | استافیلوکوک ارئوس و اپیدرمیدیس |
| انتروباکتر کلوآکه | استرپتوکوکهای بتا همولیتیک |
| کلبسیلا پنمونیه | استرپتوکوک ویریدانس |
| گونه های پروتئوس | استرپتوکوک پنومونیه |
| گونه های سالمونلا | لیستریا منوسیتوژنز |
| هموفیلوس آنفلونزا | کلستریدیوم پرفرژنز |
| پسودوموناس آئروجینوزا و پسودومالئی | انتروکوک ها |
| نایسریا منژیتیدیس | کاندیدا آلبیکانس |
| گونه های بروسلا | مالاسزیا فورفور |
| باکتروئیدس فراژیلیس | هیستوپلاسما کپسولاتوم |

## جلسه دهم: بروسلا

بروسلاها انگل‌های اجباری حیوانات و انسانها هستند که مشخصاً، به صورت داخل سلولی قرار می‌گیرند. بیماری ناشی از این باکتریها در انسان که بروسلوزیس (تب مالت، تب مواج و تب مدیترانه‌ای) نام دارد، با یک فاز باکتریمی حاد مشخص می‌شود که به دنبال آن یک مرحله مزمن ایجاد شده که می‌تواند سالهای متمادی طول کشیده و بافتهای زیادی (استخوان و غدد لنفاوی) را درگیر نماید. ۶ گونه بروسلا وجود دارد. بروسلا آبورتوس(*Brucella abortus*) بیشتر در گاوها بیماریزاست؛ بروسلا کانیس (*B. canis*) سگ‌ها؛ بروسلا ملی‌تنسیس (*B. melitensis*) بز و گوسفند؛ بروسلا نئوتوما (*B. neotomae*) موش‌های جنگلی؛ بروسلا اویس (*B. ovis*) گوسفند و بروسلا سوئیس (*B. suis*) خوک، اسب، جوندگان و گوزن شمالی را آلوده می‌کند.

### خصوصیات بروسلا

بروسلاها کوکوباسیل‌های کوچک، غیرمتحرک، غالباً بدون اسپور، بدون کپسول (ولی در موارد نادر کپسول تکامل نیافته، در سویه‌هائی که تازه جدا شده مشاهده شده است)، میله‌ای شکل با ابعاد ۰/۷– ۰/۵ میکرومتر (عرض) و ۱/۵ – ۰/۶ میکرومتر (طول) که به

بصورت منفرد و دوتایی از انتهای یکدیگر قرارگرفته‌اند و گاه در گروههای کوچک بصورت زنجیره‌های ۴ تا ۶ تایی از باکتریها هم دیده می‌شوند. بروسلا گرم منفی و غیر اسید فاست است و در کشت‌های کهنه انتهای باکتری پررنگ‌تر بوده و یا سلول باکتری رنگ‌پذیری نامنظم داشته و به صورت دو قطبی مشاهده می‌شوند.

گرچه سویه‌های آزمایشگاهی بروسلا قادر به رشد در محیطهای ساده می‌باشند، ولی اغلب بروسلاها دارای نیازهای رشد پیچیده بخصوص در جداسازی اولیه از نمونه‌ای بالینی هستند. بطورکلی عواملی چون اسیدهای آمینه، تیامین، بیوتین، نیکوتین آمید، یونهای منیزیوم، آهن و منگنز برای رشد این باکتریها ضروری است. با افزودن پانتوتئات و ایزواریترول رشد بسیاری از سویه‌ها افزایش می‌یابد، در واقع ترکیب اخیر می‌تواند بعنوان منبع انرژی برای بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا سوئیس استفاده گردد. رشد باکتریها در حضور گاز دی‌اکسید کربن Co2 افزایش می‌یابد، در عین‌حال وجود این گاز برای رشد برخی از سویه‌ها مانند گونه بروسلا آبورتوس ضروری است. از عوامل مؤثر فیزیکی در رشد این باکتریها، حرارت، pH و اسمولاریته می‌باشد. دمای اپتیمم رشد این باکتری ۳۷ درجه سلسیوس و pH مناسب رشد ۷/۴ - ۶/۶ می‌باشد و تغییرات pH در شرایط آزمایشگاهی به سمت قلیائی و اسیدی باعث مرگ بروسلا می‌شود. اسمولاریته مناسب رشد باکتری ۵ درصد تا ۱۵درصد مولار کلرید سدیم است. متابولیسم همه سویه‌های بروسلا هوازی و نیاز به اکسیژن دارند و در شرایط بی‌هوازی قابلیت رشد ندارند. متابولسیم قندها در بروسلا از نوع اکسیداتیو می‌باشد ولی تحت شرایط خاص از قندها تولید اسید می‌نماید. سویه‌های بروسلا کاتالاز مثبت و بیشتر سویه‌ها اکسیداز مثبت هستند. این باکتریها دارای فعالیت سوپراکسید دیسموتاز هستند. گلوگز توسط اغلب سویه‌ها متابولیزه می‌شود ولی ایزواریترتیول ترجیحاً توسط بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس و کمتر توسط بروسلا سوئیس و بروسلا اویس متابولیزه می‌گردد. این باکتری در بیماران، لاشه حیوانات، حیوانات آلوده و خصوصاً در دستگاه تناسلی و غدد پستان و همچنین شیر و فرآورده‌های آن وجود دارد و از طریق شیر و فرآورده‌های آن به انسان منتقل می‌شود.

## تشخیص آزمایشگاهی

از زمان کشف بروسلاها به عنوان عامل بیماری تب مالت پیشرفت‌های چندانی در روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی بیماری صورت نگرفته است. هنوز هم روش کشت و روش‌های سرولوژیکی به عنوان روش‌های تشخیصی محسوب می‌شوند. تصویر کلینیکی غالباً گمراه‌کننده است و بیماری ممکن است به صورت عفونت‌های معده و روده، دستگاه تنفس و پوست و یا دستگاه عصبی بروز کند. تشخیص احتمالی در زمینه‌های مورفولوژی، کشت، صفات سرولوژی و در نظر گرفتن اطلاعات توأم اپیدمیولوژی- بالینی بنا نهاده شده است. بررسی سیتولوژیک خون در یک فرد مبتلا به بروسلوزیس حاد یا تحت‌حاد نشان‌دهنده لکوپنی ملایم با یک لنفوسیتوز نسبی، گاه همراه با یک آنمی ثانویه و ترومبوسیتوپنی است. سدیمانتاسیون به استثناء موارد حاد معمولاً در حد طبیعی است.

نکته مهم:گونه‌های بروسلا بسیار عفونت‌زا هستند (گونه‌های بروسلا را جزء طبقه سه سطح ایمنی طبقه‌بندی می‌کنند) و کارکنان آزمایشگاه باید در کار با نمونه‌های بیمارانی که مشکوک به بروسلا هستند، خیلی مراقب باشند.

**نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه:** نمونه ارسالی جهت شناسائی بروسلاها خون، مغز استخوان، مایع مفصلی، آسپیره غدد لنفاوی، مایع نخاعی، ادرار و غیره می‌باشد. در آزمایشگاههای بالینی از روشهای زیر جهت شناسائی این باکتریها استفاده می‌گردد.

**رنگ‌آمیزی گرم:** بروسلاها معمولاً به صورت کوکوباسیل و باسیل‌های کوتاه گرم منفی کوچک، منفرد و گاهی جفتی یا زنجیره کوتاه مشاهده می‌شوند. باید توجه داشت که رنگ فوشین یا سافرانین بجای ۳۰ ثانیه باید ۳-۱ دقیقه بروی گستره باقی بماند. با روش کوستر بروسلاها به رنگ قرمز در داخل سلول‌های آبی رنگ دیده می‌شود. در این روش ابتدا از مخلوط سافرانین (دو قسمت) و پتاس (یک قسمت) که تازه تهیه شده باشد روی لام می‌ریزند و پس از یک دقیقه آن‌را می‌شویند. پس از شستن چند ثانیه اسید سولفوریک یک در هزار روی آن ریخته و مجدداً می‌شویند و محلول ۱٪ بلودومتیلن روی آن اضافه می‌نمایند و پس از ۳۰ ثانیه می‌شویند و سپس خشک کرده و مورد بررسی قرار می‌دهند.

## کشت

یکی از موارد تشخیص قطعی بروسلوزیس جداسازی باکتری از نمونه‌های بالینی است. رشد بروسلاها برروی محیط‌های معمولی بکندی صورت می‌گیرد و بیشتر گونه‌ها برروی بلادآگار و شکلات‌آگار و نه روی مکانکی و سایر محیطهای انتریک رشد می‌کنند، ولی برای رشد مناسب بروسلاها در کشت اولیه، محیط‌های جامد و مایع پیشنهاد می‌گردند که عبارتند از: محیط آگاردار حاوی عصاره کبد، نوترین‌آگار، بلادآگار، تریپتوز آگار، دکستروز پوتیتو، گلیسرول پوتیتو، محیط سرم دکستروز آگار، محیط گلیسرول‌آگار، محیط بروسلا براث و آگار، محیط اصلاح شده فارن، محیط کشت کاستاندا، محیط اصلاح شده تایرمارتین به اضافه ترکیبات خاص آنتی‌بیوتیکی که جهت محیط کشت موردنیاز می‌باشد. افزایش سرم حرارت داده شده اسب یا خرگوش به محیط‌های کشت یاد شده بالا سبب سرعت پرورش این باکتری می‌گردد. احتمال جدا کردن بروسلا از خون بیش از ۵۰٪ نیست چون نیاز تغذیه‌ای این ارگانیسم بالا و تعداد بسیار کم باکتری موجود در خون و زندگی درون سلول از جمله علل این واقعیت است. آزمایش کشت خون بیشتر از سایر نمونه‌ها جواب مثبت می‌دهد. البته لازم به ذکر است جهت کشت خون نکات متعددی باید رعایت گردد تا شانس بیشتری برای دست‌یابی به نتایج بدست آید. ایده‌آل‌ترین زمان نمونه‌گیری خون هنگامی است که بیمار در مرحله حاد و تب باشد و این نمونه برای کشت مناسب‌تر و این احتمال بخصوص برای بروسلا ملی‌تنسیس و سوئیس بیشتر است. برای افزایش احتمال جداسازی بروسلا بهتر است نمونه‌گیری در ۳ نوبت و در فواصل زمانی متفاوت انجام گیرد. لازم به ذکر است هر یک از نمونه‌های بالینی مانند مایعات بدن (ادرار، مایع نخاع، خون) و یا بافت به‌دست آمده از جراحی یا نکروسکوپی را می‌توان کشت داد. برای کشت خون نیازی به محیط انتخابی نیست، ولی در صورت آلودگی نمونه‌ها بهتر است از این محیط‌ها استفاده شود. چندین فرمولاسیون برای انتخابی نمودن محیط کشت جهت رشد ضروری است. مفیدترین محیط کشت انتخابی حاوی باسیتراسین، سیکلوهگزامید، نالیدیکسیک اسید، نیستاتین، پلی‌میکسین B و وانکومایسین در یک محیط پایه سرم دکستروزآگار شرح داده شده است. محیط کشتهای مایع نیز شامل فرمولاسیون مشابه فوق با افزودن آمفوتریسین B و سیکلوسرین می باشد که برای نمونه‌های کشت از شیر آلوده بکار می‌رود. در جدول زیر محیطهای واجد آنتی‌بیوتیکهای انتخابی برای جداسازی بروسلاها ارائه شده است.

برای اجتناب از کشت باکتری از محیط مایع به جامد می‌توان از محیط‌های دو فازی کاستاندا استفاده کرد. درکشت اولیه، بروسلا آبورتوس و بروسلا سوئیس دارای رشد ضعیفی هستند و جهت رشد نیار به ۱۰ – ۵ درصدCo2 دارند، درحالی‌که سایر گونه‌های بروسلا قادر به رشد در هوای معمولی می‌باشند. کشت خون از یک تا دو هفته پس از انجام کشت در محیط نگهداری می‌شود. برای دادن جواب منفی قطعی کشت بایستی حداقل سه هفته صبر کرد. باید توجه کرد در محیط آبگوشت ممکن است علیرغم رشد کدورت

مشاهده نشود، لذا باید حتی در غیاب کدورت بطور هفتگی ساب‌کالچر انجام شود. لازم بذکر است که محیط دی‌فازیک مثل کاستاندا نیاز به ساب‌کالچر ندارد.

بروسلا دارای سه نوع کلنیS، R و M می‌باشد. در محیط کشت آگار مغذی پرگنه‌های نوع S پس از ۴۸ ساعت قطری حدود ۵ میلی‌متر دارند و حاشیه آنها صاف و پرگنه‌ها محدب و نیمه‌شفاف و دارای سطحی براق می‌باشند (شکل۲). البته پرگنه‌ها پس از ۲ تا ۳ روز بعد از کشت اولیه بزرگتر، با تحدب بیشتر و دارای رنگ زرد کم‌رنگ هستند. کلنی S بیماریزا بوده و ممکن است در نتیجه جهش یا موتاسیون به شکلR (غیربیماری‌زا) درآید. موتان‌های خشن بروسلا آبورتوس در انسان، گاو، گوسفند، بز، خوک و خرگوش بی‌آزارند چون در سرم این حیوانات موادی وجود دارند که در آزمایشگاه مانع رشد اشکال خشن (نوع غیربیماری‌زا R) می‌گردند، ولی بر اشکال صاف (نوع بیماری‌زای S) میکروب بی‌تأثیرند و حیوانات مقاومR فاقد فاکتورهای نامبرده فوق می‌باشند. در محیط *in vitro*، اسید آمینه D- آلانین دارای همین خاصیت می‌باشد. هنگام آماده کردن محیط‌های کشت تازه لازم است که محیط کشت با باکتری‌های بروسلا استاندارد مورد آزمایش قرار گیرند چون برخی از یون‌های جگر حاوی موادی هستند که از رشد بروسلا ممانعت می‌نماید و به علاوه باید مراقب سرم‌هایی که جهت تهیه محیط‌های کشت بروسلا مورد استفاده قرار می‌گیرند بود تا حاوی پادتن‌های ضد بروسلا نباشد. در محیط‌های کشت مایعی که جهت رشد بروسلاها مورد استفاده می‌گیرند، کدر شدن محیط کشت به آرامی صورت می‌پذیرد و این امر با ته‌نشین شدن رسوبات گرانوله همراه است که به مرور در اثر افزایش طول مدت کشت، محیط کشت حالت چسبنده پیدا می‌کند. برخی از سویه‌های بروسلا تمایل بیشتری به رشد در محیط مایع نسبت به محیط جامد دارند. در این روش تکنسین آزمایشگر درصد بالائی درمعرض آلودگی می‌باشد. البته خود این مدت زمان طولانی عوارضی مانند جهش درماده وراثتی DNA و از دست رفتن سوش موردنظر و یا آلودگی را به همراه دارد، ضمناً برای تشخیص قطعی باکتری نیاز به آزمایشات بیوشیمیائی، حسّاسیت به رنگ‌ها و استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی ضروری است.

**نکات مهم:**

- منفی بودن کشت‌ها از نظر بروسلا نشانگر عدم ابتلا به بیماری نیست، چرا که بروسلاها فقط در جریان مرحله بیماری و یا در جریان فعالیت دوباره بیماری از کشت‌ها به‌دست می‌آیند.

- این باکتری روی بلادآگار کلنی‌های شبیه استرپتوکوک ویریدانس ایجاد می‌کند و در محیط‌های حاوی نمک‌های صفراوی، تلوریت و سلنیت قادر به رشد نیست.

- محیط‌های مایعی که برای کشت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده می‌شود، رشد بعضی از سویه‌های بروسلا را فراهم می‌کند.

جدول۱- محیطهای واجد آنتی‌بیوتیکهای انتخابی برای جداسازی بروسلا

| Selective agent | Concentration of Selective in basal medium | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Harticys Digest agar | Serum Dextroseagar | 5% blood agar | Serum Dextrose agar | Pepton Soya broth with 5% horse serum |
| Bacitracin (units/ml) | - | 25 | - | 25 | 50 |
| Penecillin (units/ml) | 5 | - | 5 | - | - |
| Vancomycin (mg/ml) | - | - | - | 50 | 50 |
| Ristocetin (mg/ml) | - | - | 10 | - | - |
| Polymyxin B (units/ml) | | 4 | 10 | 5 | 5 |
| Nalidicxic acid (mg/ml) | - | - | 10 | 5 | 5 |
| Cetrimide | - | - | 1:4000 | - | - |
| Nystatin (units/ml) | - | - | 100 | 100 | 100 |
| Amphotericin (mg/ml) | - | 10 | - | - | 4 |
| Cyclohexamide (mg/ml) | 100 | 100 | 150 | 100 | 100 |
| Gention violet(mg/ml) | 4 | - | - | - | - |

**محیط انتخابی و کشت در حضور رنگ (حساسیت به رنگهای مختلف)**

بروسلا در برابر رنگ‌زدائی محلول اسیدی و قلیائی مقاومت می‌کند و می‌توان از این مشخصه برای ایجاد روشهای رنگ‌آمیزی افتراقی برای بررسی حضور این باکتری در بافتها و مواد مورد آزمایش بهره جست. برای اولین بار برای افتراق بین بروسلا آبورتوس، ملی‌تنسیس و سوئیس بر پایه حساسیت نسبت به اثر مهاری برخی رنگهای سنتتیک ابداع گردید و تا به امروز نیز معتبر است. رنگهایی که در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: تیونین، فوشین قلیائی، متیل ویوله و پیرونین که تماماً اینها به محیط حاوی سرم دکستروزآگار اضافه می‌گردند.

**بررسی خصوصیات بیوشیمیائی**

بروسلاها هوازی اجباری می‌باشند و دارای متابولیسم تنفسی بوده و قدرت تخمیری ندارند. کاتالاز مثبت، اکثراً اکسیداز مثبت، اوره‌آز و نیترات مثبت، VP,MR و اندل منفی بوده و ژلاتین را ذوب نمی‌کنند. در جدول زیر الگوی فعالیت اکسیداتیو گونه‌های بروسلا برای برخی اسیدهای آمینه و کربوهیدراتها نشان داده شده است.

جدول ۲- الگوی فعالیت اکسیداتیو گونه‌های بروسلا برای برخی اسیدهای آمینه و کربوهیدراتها

| Amino acids | Species | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | B. melitensis | B. abortus | B. suis | B. neotoma | B. canis | B. Ovis |
| L.Alanine | + | + | V | V | V | V |
| L.Asparagine | + | + | V | + | - | + |
| L.Glutamate | + | + | V | + | + | + |
| L.Arginine | - | - | + | - | + | - |
| DL.Citrulline | - | - | + | - | + | - |
| L.Lysine | - | - | V | - | + | - |
| DL.Ornithine | - | - | + | - | + | - |
| Carbohydra-tes | | | | | | |
| L.Arabinose | - | + | V | + | V | - |
| D.Galactose | - | + | V | + | V | - |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| D.Ribose | - | + | + | V | + | - |
| D.Xylose | - | V | - | - | - | - |
| D.Glucose | + | + | + | + | + | - |
| Isoerythritol | + | + | + | + | V | - |

تست اوره‌آز:

بروسلاها به استثناء اویس قادرند اوره را تجزیه نمایند، ولی فعالیت اوره‌آز در انواع مختلف متفاوت است. بروسلا سوئیس به سرعت در مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه، بروسلا آبورتوس در مدت ۱۲۰ دقیقه و بروسلا ملی‌تنسیس بطور متغیر اوره‌آز مثبت می‌باشد. برای انجام تست یک لوپ از میکروب را روی محیط اوره‌آگار برده و در صورتی که مثبت باشد تغییر رنگ حاصل می‌شود.

تست تولید H2S:

خاصیت تولید H2S یکی از خصوصیاتی است که برای انواع بروسلاها از یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. بروسلا اویس، ملی‌تنسیس و کانیس H2S تولید نمی‌کنند و آبورتوس، نئوتومه و سوئیس H2S در مدت حداقل تا ۴ روز تولید می‌نمایند.برای انجام تست باید کاغذ مرکب خشک‌کن را در محلول استات سرب ۱۰٪ فرو برده و خشک نمود و سپس آن را پس از کشت میکروب در فاصله دیواره لوله و پنبه دهانه محیط قرار داد. در صورتی که H2S تولید و متصاعد شود نوار کاغذ سیاهرنگ می‌گردد، در غیر این‌صورت تغییر رنگ نمی‌دهد. با تعویض کاغذ در هر روز می‌توان متوجه شد تا چند روز H2S تولید می‌شود.

- از غلظت رنگ تیونین ۵۰۰۰۰: ۱ یا ۱۰۰۰۰۰: ۱و از غلظت فوشین بازی ۵۰۰۰۰: ۱ در محیط‌ها استفاده می‌گردد.

تست‌های سرولوژی : از تست رایت که یک نوع آزمون آگلوتیناسیون می‌باشد به همـــــــراه ME۲ (۲-مرکاپتو اتانل) جهت شناسائی بروسلا در مرحله حاد یا مزمن استفاده می‌شود. این تست امروزه اساس تشخیص ابتلاء افراد به تب مالت در کشور ما می‌باشد و بدلیل اینکه کشت بروسلا وقت‌گیر است و باید در زیر هود کلاس ۲ ایمنی زیستی انجام شود، کشت خیلی مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. امروزه برای تشخیص از الیزا (پروتئین‌های سیتوپلاسمیک) استفاده می‌شود که از روش آگلوتیناسیون حساس‌تر و اختصاصی‌تر است.

تست پوستی بورنه:

هنگامی که عصارهٔ پروتئین بروسلا به صورت داخل جلدی تزریق شود قرمزی، ادم و سفتی طی ۲۴ ساعت در برخی از افراد آلوده ایجاد می‌شود. هرچند که آزمون پوستی غیر قابل‌اعتماد است و بندرت مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی این تست در مطالعات

اپیدمیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد و منفی شدن آن موجب حذف بروسلوزیس از تعداد کثیری از حملات مختلف می‌گردد. به‌کار بردن آزمون پوستی ممکن است باعث افزایش تیترآگلوتینین‌ها شود.

بیماریزایی تجربی در حیوان: خوکچهٔ هندی در برابر تمام سوش‌های بروسلا حسّاس می‌باشد. هیچ‌یک از این تست‌ها قادر نیستند حیوانات حامل بیماری را از حیواناتی که جدیداً آلوده شده‌اند تفکیک نمایند.

حساسیت به باکتریوفاژها: فاژهای مختلف نسبت به سویه‌های باکتریائی یک گونه ویژگی نشان می‌دهند، از اینخاصیت جهت فاژتایپینگ و برای تعیین جنس و گونه بروسلا استفاده می‌شود. این فاژها را به ۵ گروه مجزا تقسیم می‌کنند که درنشان داده شده‌اند.

### روشهای مولکولی:

در آزمایشگاههای پیشرفته از تکنیـک مولکولی PCR، PCR-RFLP، Multiplex PCR،Real-PCR و غیره برای تشخیص مستقیم بروسلاها در نمونه استفاده می‌گردد.

### تشخیص افتراقی:

بروسلاها را باید از باسیل غیرتخمیری مثل بوردتلا، موراکسلا، کینگلا و اسینتوباکتر افتراق داد.

کلید تشخیصی بروسلاها: کوکوباسیل گرم منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت، غیرهمولیتیک، لاکتوز، گلوکز منفی، هوازی اجباری و اوره‌آز مثبت. ایجاد آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم ضد بروسلا تشخیص را تأئید می‌نماید.

## جلسه یازدهم: تعیین حساسیت میکروبی Antimicrobial Susceptibility Test

تعریف آنتی بیوتیک : آنتی بیوتیک ها مواد ضدمیکروبی هستند که توسط بعضی از موجودات زنده مثل : باکتریها ، کپک ها و اکتینومسیت ها تولید می‌شوند و اثرضدمیکروبی برروی سایر میکروارگانیسم‌ها دارند.

اثرات انتی بیوتیک‌ها روی باکتریها به ۲ صورت :

۱-باکتریو سیدی: سبب مرگ باکتریها می‌شود.

۲-باکتریو استاتیکی : سبب توقف رشد باکتریها می‌شود.

برای افتراق این دو اثر از دو اصطلاح MIC وMBC استفاده می‌شود.

MIC (Minimum Inhibitory Concentration) حداقل غلظتی از آنتی بیوتیک که می‌تواند رشد باکتری را متوقف کرد.

MBC (Minimum Bactericidal Concentration) حداقل غلظتی از دارو که باعث مرگ باکتری می‌شود.

برای انتخاب بهترین دارو در یک عفونت یا بیماری از روش‌های زیر استفاده می‌شود.

۱-روش تهیه رقت در لوله (Broth dilution test)

۲-روش آگار دایلوشن (Agar dilution test)

۳-روش انتشار دیسک در آگار (Disk diffusion یا Kirby Bauer)

۴-E test (نوارهای پلاستیکی هستند که با غلظت مشخص از آنتی بیوتیک آغشته شده‌اند.)

تعریف دواصطلاح :

۱-سینرژیسم (Synergism) : وقتی دوآنتی بیوتیک اثر یکدیگر را تقویت کنند. مثل کوتریموکسازول که ترکیب (تری متوپریم +سولفامتوکسازول)

۲-آنتاگونیسم (Antagonism) : وقتی که تجویز دو آنتی بیوتیک با هم در درمان یک بیماری اثر کاهشی داشته باشد. مثل: تجویز توام (کربنی سیلین و تتراسیکلین)

| مؤثر روی گرم مثبت ها | موثر روی گرم منفی ها |
|---|---|
| **TE (تتراسیکلین)** | **آمینوگلیکوزید ها**<br>**مثل:**<br>**جنتامایسین-**<br>**آمیکاسین_استرپتومایسین-**<br>**توبرامایسین - کانامایسین** |
| **ماکرولیدها مثل:**<br>**اریترومایسین -**<br>**آزیترومایسین -**<br>**کلاریترومایسین-** | **کینولون ها**<br>**مثل:**<br>**نالیدیکسیک‌اسید=سیپروفلوکساسین** |
| **(باسیتراسین) روی گرم مثبث ها و نایسریا ها اثر دارد** | |
| **(ونکومایسین) روی استافیلوکوک‌های مقاوم به بتالاکتام و گرم مثبت ها اثر دارد.** | |

طیف اثر آنتی بیوتیک‌ها :

۱-آنتی بیوتیک‌های مهارکننده سنتز پروتئین با اثر بر روی جزء 30S ریبوزوم مثل: آمینوگلیکوزیدها و جزء 50S مثل:کلرامفنیکل، ماکرولیدها

۲-آنتی بیوتیک‌های مهارکننده سنتز cell wall مثل: بتالاکتام‌ها

۳-آنتی بیوتیک‌های مهارکننده سنتز نوکلئیک اسید مثل :کینولونها

نگهداری آنتی بیوتیک‌ها : قطر آن حدود ۶ میلی متر می باشد. فریزر۲۰- بهترین دما برای نگهداری آنها می باشد. حرارت باعث می شود خواص خود را از دست بدهند. قبل از مصرف۲-۱ ساعت در حرارت محیط گذاشته شود.

## رهنمودهای CLSI

Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) یک ارگان متشکل از اعضای بین المللی بوده که هرساله استانداردهای انجام وتفسیر تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی را ارائه می‌کند. حاوی جداول و نکاتی عمومی و اختصاصی برای تمام باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است. CLSI زمانی کاربرد دارد که باکتری‌ها کاملا تعیین هویت شده باشد حال بخواهیم مطابق این جدول آنتی بیوتیک مناسب آن را بگذاریم در واقع این جدول از مصرف آنتی بیوتیک زیاد جلوگیری می‌کند و راه ما را مشخص می‌کند.

## روش Disk diffusion یا Kirby-Bauer

این روش یکی از روش‌های روتین و کاربردی در آزمایشگاه می‌باشد. این روش بیشتر برای باکتریهایی که رشد سریع دارند و نیز تعیین حساسیت دارویی میکروارگانیسم های جدا شده از محل عفونت استفاده می‌شود.

دراین روش دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک روی محیط کشت جامد قرار می‌گیرند. این دیسک ها با غلظت مشخصی از آنتی بیوتیک آغشته شده‌اند. محیط کشت مورد استفاده در این روش مولر هینتون آگار و سنسیتیو تست آگار Sensitive test Agar می‌باشد. این محیط‌ها بدلیل دارا بودن اسیدهای آمینه مختلف مثل عصاره مخمر، فاکتورهای رشد و عصاره گوشت شرایط را برای رشد اغلب باکتریهای پاتوژن فراهم می‌کنند. باکتریهایی بی‌هوازی برروی این محیط‌ها قادر به رشد نیستند. همچنین برای رشد استرپتوکوک‌ها و هموفیلوس‌ها به این محیط٪۵ خون گوسفند اضافه می‌کنند. در مورد نایسریاها از محیط مغذی شکلات آگار استفاده می‌شود. البته باید دقت داشت که اضافه کردن خون به محیط اشکالاتی ایجاد می‌کند چون آهن موجود در خون با بسیاری آنتی بیوتیک‌ها از جمله آمینوگلیکوزیدها اثر آنتاگوتیسمی دارد.

در این روش آنتی بیوتیک از دیسک به محیط اطراف منتشر شده و مانع از رشد نمونه میکروبی می‌شود. با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد می‌توان حساسیت باکتری را تعیین کرد.

بطورکلی قطر هاله عدم رشد به عوامل گوناگونی بستگی دارد:

سرعت انتشار آنتی بیوتیک در محیط کشت

غلظت آنتی بیوتیک

تعداد باکتری تلقیح شده

سرعت رشد باکتری

دوره انکوباسیون

عمق آگار(محیط کشت)

روش کار: ابتدا در یک لوله استریل که حاوی2-3 mL سرم فیزیولوژی استریل است یک لوپ از باکتری مورد نظر را حل کرده و خوب مخلوط می‌کنیم تا یکنواخت شود.

به منظور استاندارد نمودن، کدورت سوسپانسیون میکروبی را با لوله شماره ۰/۵ مک فارلند مقایسه می‌نماییم.

این محیط به مدت ۶ ماه در تاریکی و ظرف درب بسته قابل نگهداری است در صورت مشاهده رسوب در لوله غیرقابل استفاده می‌شود.

تعداد تقریبی باکتری در این محیط $1.5\times10^8$ CFU/ml است.

دیسک ها با پنس استریل در سطح قرار داده و با کمی فشار آنها را کاملا بر سطح آگار بچسبانید.

دقت شود فاصله دیسک‌ها از هم حدود ۲cm و از لبه پلیپ حدوداً ۱-۱/۵cm باشد.

پلیت‌ها را بصورت وارونه در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری کنید.

پس از طی دوره انکوباسیون بوسیله خط کش ، قطر هاله عدم رشد را در اطراف دیسک‌ها اندازه گیری کنید با توجه به جدول به صورت (Sensitive (Susceptible، Resistant، Intermediate گزارش کنید.

اگر به صورت یک دست رشد نکرده باشد، برداشت کلونی کم بود.

اگر همه حساس یا همه مقاوم شدند، تجدید کشت شود.

اگر pH محیط مناسب نباشد، نتیجه اشتباه است.

**دستگاه Dispenser :**

دستگاهی است که دیسکها را بصورت اتوماتیک با فاصله استاندارد از یکدیگر از لبه پلیت برروی محیط کشت پرتاب می‌کند. اشکال این دستگاه این است که می‌بایستی از این دو دستگاه دو عدد یکی مختص گرم منفی و یکی مختص گرم مثبت باشد.

## روش E-test

نوارهای پلاستیکی مخصوص E test بصورت شعاعی بر سطح آگار قرار داده می‌شود. هر نوار بصورت گرادیان غلظتی توسط یک آنتی بیوتیک آغشته شده است. ابتدای نوار که از غلظت کمتری برخوردار است به سمت مرکز پلیت قرار دارد. پس از کاشت نوارها، پلیت را به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری کرده سپس هاله بیضوی شکل عدم رشد نمایان می‌شود.

**موفق باشید**