عنوان دوره آموزشی

روش تشخیص آزمایشگاهی میکروب‌های گرم منفی و گرم مثبت

بهار ۱۳۹۶

بسم الله الرحمن الرحيم

گروه‌های هدف

تکنسین، کاردان و کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی

هدف کلی: افزایش دانش و آگاهی پرسنل در مورد تشخیص میکروب های گرم مثبت و گرم منفی

روش و نحوه اجرای آموزش

با توجه به اینکه هدف این مجموعه آموزشی افزایش دانش و آگاهی در مورد تشخیص میکروب های گرم مثبت و گرم منفی در آزمایشگاه می‌باشد بنابراین می‌تواند جهت ارائه بهتر مطالب به روش حضوری در قالب کارگاه آموزشی و عملی ارائه شود و یا جهت پوشش تعداد بیشتری از آموزش گیرندگان بصورت غیرحضوری و در قالب کتاب‌خوانی انجام گیرد.

مدت دوره آموزشی: ۱۵ساعت

ارزشیابی

در پایان دوره بمنظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرایند، یک ارزشیابی از شرکت کنندگان به صورت تست‌های چهار گزینه‌ای بعمل خواهد آمد.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

مقدمه: ۱

تقسیم‌بندی میکروارگانیسم‌ها: ۱

مشخصات پروکاریوت‌ها: ۲

اشکال باکتری‌ها: ۲

نامگذاری برحسب طرز قرار گرفتن باکتری‌ها: ۳

ساختار سلول پروکاریوتی: ۴

اجزای اختصاصی دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم مثبت ۵

اجزای اختصاصی دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم منفی ۵

طبقه‌بندی باکتری‌ها ۶

معیارهایی برای طبقه‌بندی باکتری‌ها ۶

روش مطالعه باکتری‌ها ۸

کوکسی‌های گرم مثبت ۱۰

استافیلوکوک‌ها ۱۰

استرپتوکوک ۱۳

انتروکوک ۱۵

کوکسی‌های گرم منفی ۱۷

نیسریاگنوره ۱۸

نیسریا مننژیتیدیس ۱۹

باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار ۱۹

گونه‌های باسیلوس ۱۹

باسیلوس آنتراسیس ۱۹

باسیل سرئوس ۲۱

کلستریدیوم ۲۱

کلستریدیوم بوتولینوم ۲۱

کلستریدیوم تتانی ۲۲

کلستریدیوم پرفرینجنس (باسیل ولشای) ۲۲

کلستریدیوم دیفیسیل ۲۳

باسیل‌های گرم مثبت بدون اسپور ۲۳
اریزیپلوترکیس روزیوپاتیه ۲۴
کورینه باکتریوم ۲۵
نوکاردیا ۲۶
مایکو باکتریوم ۲۷
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۲۷
مایکوباکتریوم لپره ۲۸
باسیل‌های گرم منفی ۲۸
انتروباکتریاسیه ۲۸
اشریشیاکلی ۳۰
سالمونلا ۳۰
شیگلا ۳۱
بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه مدفوع ۳۲
انتخاب، تلقیح و انکوباسیون محیط‌های کشت مدفوع ۳۳
شیگلا ۳۵
واکنش‌های بیوشیمیایی تشخیصی شیگلا: ۳۹
نامگذاری سالمونلا: ۴۳
موارد استثناء واکنش‌های بیوشیمیایی تشخیص سالمونلا: ۴۸
سالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک: ۵۱
هـ) گزارش نتایج: ۵۱
یرسینیا ۵۱
کلبسیلا ۵۲
پروتئوس ۵۲
ویبریو ۵۳
کمپیلوباکتر ۵۴
هکیلوباکتر ۵۴
بروسلا ۵۶
سودومونا ۵۷

مقدمه:

اصطلاح میکروبیولوژی از سه جزء میکرو (Micro)= کوچک، بیو (Bio)= زنده یا زندگی و لوژی (Logy) به معنای علم یا شناسایی تشکیل شده است. کلمه میکروب (Microbe) یا جرم (Germ) که امروزه به جای آن از کلمه میکروارگانیسم (Microorganism) استفاده می‌شود، اولین بار توسط سدیو (Sedillot) در سال ۱۸۷۸ میلادی مورد استفاده قرار گرفت و شامل کلیه موجودات زنده ذره‌بینی می‌شود. جانداران ذره‌بینی به علت کوچکی ابعاد فقط به کمک میکروسکوپ قابل رؤیت می‌باشند.

میکروب‌شناسی علمی است که از شکل، ساختمان، فیزیولوژی، متابولیسم و کلیه خواص میکروارگانیسم‌ها بحث می‌کند و رابطه بین این موجودات و بروز برخی از بیماری‌ها در انسان، جانوران و گیاهان را مورد بررسی قرار می‌دهد.

تقسیم‌بندی میکروارگانیسم‌ها:

۱) اوکاریوت‌ها

- جلبک‌ها (الک‌ها) Alges
- پروتوزوئرها (تک یاخته‌ها) Protozoa
- قارچ‌ها Fungi
- کپک‌های لزج Slime molds

۲) پروکاریوت‌ها

- او باکترها
- سیانو باکترها
- آرکی باکترها

موجودات ذره‌بینی در ۲ گروه کلی اوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها تقسیم‌بندی شده که اوکاریوت‌ها به دلیل داشتن هسته مشخص به ۳ شاخه پروتوزوئرها، جلبک‌ها و قارچ‌ها تقسیم‌بندی شده‌اند. باکتری‌ها به دلیل داشتن ساختمان ساده سلولی و نداشتن هسته مشخص در گروه پروکاریوت‌ها قرار گرفته‌اند که خود شامل باکتری‌ها،

باکتری‌های فاقد دیواره سلولی (مایکوپلاسما)، باکتری‌ها با زندگی اجباری داخل سلولی (ریکتزیا) و ارکی باکتری‌ها تقسیم‌بندی شده‌اند.

مشخصات پروکاریوت‌ها:

به طور متوسط اندازه‌ای حدود ۱۰ میکرون داشته، دیواره سلولی (که در باکتری گرم مثبت و منفی متفاوت بوده) غشاء سیتوپلاسمی، سیتوپلاسم، هسته (که فاقد غشا مشخصی بوده و دارای یک کروموزوم حاوی DNA حلقوی است)، اندام‌های حرکتی (به صورت فلاژل یا تاژک)، ریبوزوم s ۷۰ دارند.

تقسیم در باکتری‌ها به صورت تکثیر غیرجنسی می‌باشد.

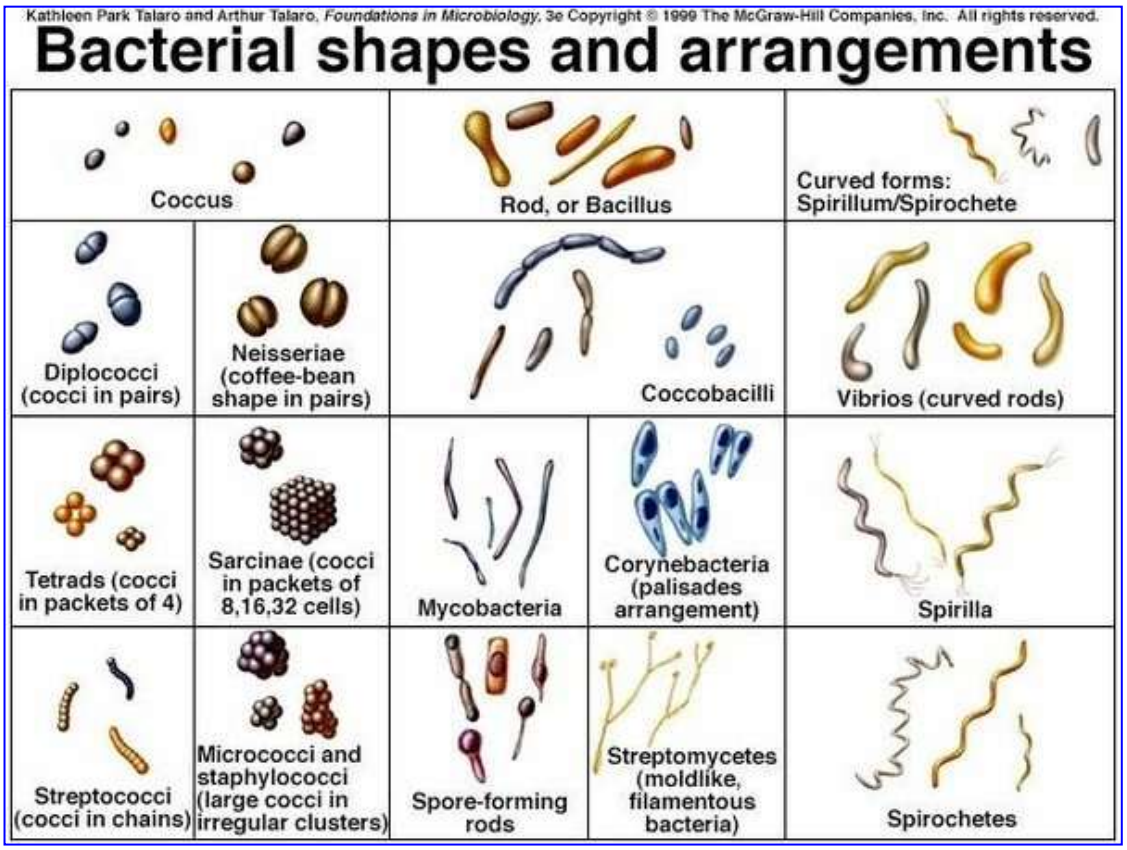
دیواره سلولی باکتری‌ها دارای ساختمان پیچیده‌ای بوده و براساس آن باکتری‌ها به دو دسته گرم مثبت و گرم منفی دسته‌بندی می‌شوند.

در باکتری‌های گرم مثبت دیواره سلولی دارای پپتید و گلیکان ضخیمی بوده و در باکتری‌های گرم منفی دیواره سلولی دارای ساختار پپتید و گلیکان نازک به همراه غشا خارجی می‌باشد. در برخی انواع مانند مایکوپلاسما باکتری فاقد دیواره سلول می‌باشد.

اشکال باکتری‌ها:

باکتری‌ها دارای اشکال کروی، میله‌ای، میله‌ای کوتاه و خمیده می‌باشد.

کروی (کوکسی)، میله‌ای (باسیل)، میله‌ای کوتاه (کوکو باسیل)، خمیده (ویبریون)، مارپیچی و غیرقابل انعطاف (اسپریل)، فنری شکل و قابل انعطاف (اسپیروکت)



نامگذاری برحسب طرز قرار گرفتن باکتری‌ها:

اگر تقسیم باکتری‌ها در یک سطح صورت گرفته و باکتری‌ها دو به دو به یکدیگر اتصال داشته باشند، دیپلوکوک یا دیپلوباسیل نامیده شده، اگر تقسیمات سلول باکتری‌ها در یک سطح و دنبال همدیگر قرار گیرند استرپتوکوک یا استرپتوباسیل گویند. اگر تقسیم در دو سطح عمود بر هم باشد، اشکال چهارتایی بنام تتراد ایجاد شده و هرگاه تقسیم سلولی در سه سطح عمود بر هم انجام گیرد توده‌های هشت‌تایی به نام سارسین ایجاد می‌گردد. اگر تقسیمات سلولی به طور نامنظم در سطوح مختلف صورت گیرد اشکال خوشه انگوری ایجاد کرده که به آن استافیلوکوک گویند.

لازم به ذکر است شکل باکتری ثابت نبوده و در اثر برخی عوامل مانند درجه حرارت و رطوبت محیط، سن باکتری، واکنش به مواد موجود در محیط کشت این اشکال تغییر می‌یابد.

ساختار سلول پروکاریوتی:

۱- شبه هسته: باکتری‌ها هسته حقیقی ندارند، آن‌ها DNA خود را در ساختاری به نام شبه هسته (نوکلوئید) بسته‌بندی می‌کنند. شبه هسته با رنگ‌آمیزی فولگن مثبت بوده و رنگ فولگن را می‌پذیرد که بیانگر حضور DNA است. DNA موجود در باکتری‌ها حلقوی بوده و تعداد شبه هسته و تعداد کروموزوم‌ها بستگی به شرایط رشد دارد.

۲- ساختارهای سیتوپلاسمی: باکتری‌ها فاقد میتوکندری و کلروپلاست بوده ولی در عوض آنزیم‌های انتقال الکترون در غشاء سیتوپلاسمی جای گرفته‌اند.

۳- پوشش سلولی: باکتری‌ها توسط لایه‌های پیچیده پوششی احاطه شده‌اند که از نظر ترکیب با هم متفاوت می باشند. این ساختارها ارگانیسم را در شرایط محیطی وجود مواد شیمیایی، آنتی‌بیوتیک‌ها و اسمولاریته بالا حفاظت می‌کند.

غشا سیتوپلاسمی که غشای سلولی نیز نامیده می‌شود، یک غشا واحد متشکل از فسفولیپیدها، پروتئین‌ها که فاقد استرول می‌باشند (به استثنای مایکوپلاسما که در غشا سیتوپلاسمی خود دارای استرول می‌باشد).

غشا سیتوپلاسمی در امر نفوذپذیری انتخابی و انتقال مواد و محلول‌ها، انتقال الکترون و دفع آنزیم‌های هیدرولیتیک نقش دارند.

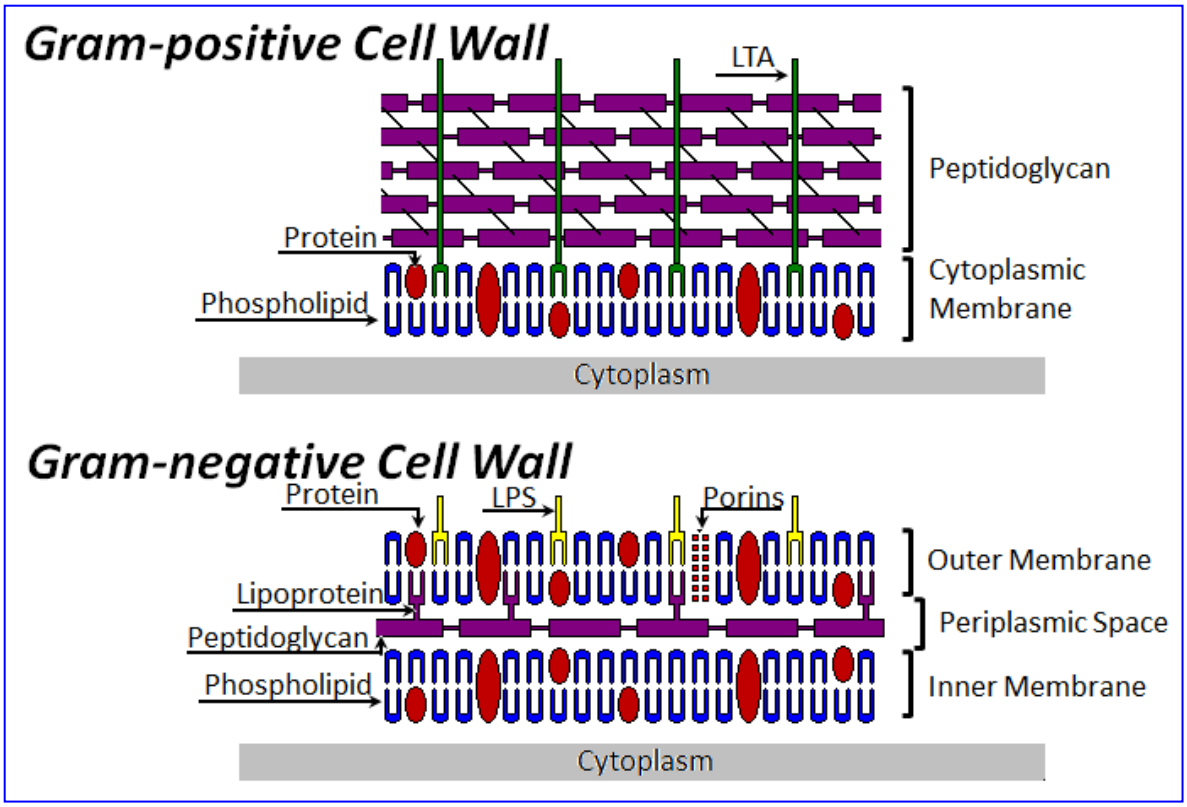
۴- دیواره سلولی: قدرت دیواره سلولی باکتری‌ها مربوط به وجود لایه‌ای است که از مورین، موکوپپتید یا پپتیدوگلیکان (همگی به یک معنا هستند) تشکیل شده است.

دیواره سلولی باکتری را در مقابل فشار اسمزی حفظ می‌نماید و در تقسیم سلولی نیز نقش ضروری دارد.

باکتری‌ها براساس پاسخ به رنگ‌آمیزی گرم (Gram) به عنوان گرم مثبت و منفی طبقه‌بندی می‌شوند که این امر مربوط به ترکیبات دیواره سلولی باکتری می‌باشد.

لایه پپتیدوگلیکان پلیمر پیچیده متشکل از سه جزء می‌باشد:

یک داربست متشکل از مولکول‌های N- استیل گلوکز آمین و N- استیل مورامیک اسید، مجموعه‌ای از زنجیره‌های جانبی تترا پپتیدی متصل به N- استیل مورامیک اسید و مجموعه‌ای از پل‌های عرضی می‌باشد.



اجزای اختصاصی دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم مثبت

دیواره سلولی اکثر باکتری‌های گرم مثبت حاوی مقادیر زیادی اسید تیکویک و تیکورونیک اسید می‌باشد، که آنتی‌ژن‌های سطحی اصلی گونه‌های گرم مثبت را تشکیل می‌دهند.

پلی ساکاریدها مانند مانوز، آرابینوز، رامنوز و گلوکز آمین و قندهای اسیدی مانند اسید گلوکورونیک و اسید مانورونیک در باکتری‌های گرم مثبت دیده می‌شود.

اجزای اختصاصی دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم منفی

دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی دارای سه جزء می‌باشد که در لایه خارجی پپتیدوگلیکان قرار دارند: لیپوپروتئین، غشای خارجی و لیپوپلی ساکارید.

• غشاء خارجی: دارای دو لایه بوده که سطح خارجی آن حاوی لیپوپلی ساکارید (LPS) است. این غشاء باکتری را در مقابل مواد مضر مانند نمک‌های صفراوی در روده حفظ می‌کند.

• لیپو پلی ساکارید: در باکتری‌های گرم منفی حاوی لیپید A بوده که لیپید A برای عملکرد بسیاری از پروتئین‌های غشاء خارجی ضروری است. لیپو پلی ساکارید به شدت برای حیوانات سمی است و بنام اندوتوکسین باکتری‌های گرم منفی نامیده می‌شود.

• لیپو پروتئین: لایه‌های پپتیدوگلیکان و غشا را به همدیگر متصل می‌کند و سبب پایداری غشاء خارجی می‌گردد.

طبقه‌بندی باکتری‌ها

واژه‌نامه‌ای که به طور یکسان خصوصیات ویژه ارگانیسم‌های عفونی را معرفی نماید و از آشفتگی رده‌بندی باکتری‌ها جلوگیری کند، نیاز می‌باشد.

نامگذاری یا تاکسونومی (Taxonomy) به معنی نظم‌دهی جهت مطالعه تنوع، تشابه و ارتباط بین باکتری‌ها به کار می‌رود. تاکسونومی شامل طبقه‌بندی Classification، نامگذاری Nomenclature و تعیین هویت Identification سه موضوع مجزا ولی مرتبط از دانش رده‌بندی یا تاکسونومی هستند.

طبقه‌بندی ارگانیسم‌های پروکاریوتی مانند باکتری‌ها نیازمند اطلاعات به دست آمده از روش‌های تحقیقاتی و نظری است و خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیک، ژنتیک و مرفولوژیک ضروری هستند.

نامگذاری، نامیدن یک ارگانیسم براساس خصوصیات آن طبق قوانین بین‌المللی است.

معیارهایی برای طبقه‌بندی باکتری‌ها

۱- رشد بر روی محیط‌ها

باکتری‌های پاتوژن (بیماری‌زا) زیادی می‌توانند بر روی محیط‌های جامد حاوی آگار جداسازی گردند. کشت عمومی اغلب باکتری‌ها محتاج محیط‌های غنی از مواد غذایی متابولیک است. این محیط‌ها عموماً شامل آگار، یک منبع کربن و یک منبع تجزیه شده هیدرولیتیک می‌باشد.

- محیط‌های غیرانتخابی: بلاد آگار و شکات آگار نمونه‌هایی از محیط‌های کمپلکس و غیرانتخابی هستند که رشد بسیاری از باکتری‌ها مختلف را حمایت می‌کنند.

محیط‌های غیرانتخابی برای جداسازی باکتری‌های ناشناخته از یک نمونه اهمیت دارد.

- محیط‌های انتخابی: به سبب تنوع میکروارگانیسم‌هایی که معمولاً در برخی از محل‌های نمونه‌برداری (مانند لوله گوارش) وجود دارد، برای حذف یا کاهش تعداد زیادی از باکتری‌های غیرمربوط در این نمونه‌ها استفاده می‌شود. در این محیط کشت‌ها مواد شیمیایی را طوری انتخاب می‌کنند که امکان رشد باکتری‌های خاصی را فراهم نماید.

اساس محیط‌های انتخابی ترکیب بودن یک عامل مهاری در محیط است. برخی از این عوامل مهاری مانند سدیم آزید، املاح صفراوی، نالیدیکسیک اسید را می‌توان نام برد.

- محیط‌های افتراقی: این محیط‌ها به منظو تشخیص و تمایز باکتری‌های مختلف از همدیگر بکار می‌رود و با توجه به خصوصیات و رفتارهای بیوشیمیایی خاص باکتری‌ها این امکان را به جا می‌دهد که به کمک این محیط کشت‌ها باکتری‌ها را از هم تمیز دهیم به عنوان مثال برخی از باکتری‌ها در طی فرآیند کشت، رنگدانه‌های خاصی را تولید می‌کنند که فعالیت این پروتئین‌ها اغلب به صورت‌های مختلفی ظاهر می‌شود مانند ایجاد همولیز در محیط بلاد آگار، تخمیر یا عدم تخمیر لاکتوز با ایجاد کلنی‌های بی‌رنگ روی مک کانکی توسط سالمونلا.

۲- بررسی میکروسکوپی باکتری‌ها

رنگ‌آمیزی نمونه‌های میکروبی با روش رنگ‌آمیزی گرم که یکی رایج‌ترین و کاربردی‌ترین زنگ‌آمیزی‌هاست برای بررسی باکتری‌ها با میکروسکوپ نوری یکی از روش‌های مفید در دسته‌بندی باکتری‌ها می‌باشد. این روش بر مبنای تفاوت‌های اساسی در ساختار دیواره سلولی صورت می‌گیرد.

باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره سلولی شبکه مانند ضخیم ساخته شده از پپتیدوگلیکان بوده در حالی‌که باکتری‌های گرم منفی دارای لایه ظرفیت‌تری می‌باشند.

۳- آزمون‌های بیوشیمیایی

مانند تست اکسیداز برای تشخیص ارگانیسم‌ها براساس حضور یا غیاب یک آنزیم تنفسی، سیتوکروم C که فقدان آن اعضای انتروباکتریاسه را از سایر باسیل‌ها گرم منفی متمایز می‌سازد.

۴- آزمون‌های ایمنی شناختی- سروتیپ‌ها، سروگروه‌ها و سرووارها

با به کارگیری آنتی‌بادی‌های پلی کلونال یا منوکلونال که با ساختارهای اختصاصی سطح سلولی باکتری‌ها مانند لیپو پلی ساکارید، فلاژل، آنتی ژن‌های کپسولی واکنش می‌دهند، در تعیین سروتیپ‌ها و سرووارها نقش مهمی دارد.

روش مطالعه باکتری‌ها

برای شناسایی، تشخیص، تعیین هویت، طبقه‌بندی، مشاهده شکل باکتری از روش‌های زیر استفاده می‌شود:

- آزمایش مستقیم
- کشت
- آزمایشات سرولوژیکی
- بررسی خواص حیاتی
- تلقیح به حیوان حساس

۱- آزمایش مستقیم: پس از تهیه لام مستقیم از محل ضایعه و یا از کلنی باکتری بعد از انجام کشت و بررسی آن در زیر میکروسکوپ، باکتری‌ها را از لحاظ شکل، اندازه، طرز قرار گرفتن، رنگ‌آمیزی و حرکت می‌توان مطالعه کرد. در آزمایش مستقیم می‌توان میکروب‌های زنده را بدون رنگ‌آمیزی بین لام و لامل (Wet

Mount) قرار داده که این مورد بیشتر برای بررسی حرکت باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای شناسایی راحت‌تر و تعیین اندازه و شکل باکتری‌ها، تهیه گسترش از نمونه موردنظر و رنگ‌آمیزی آن با میکروسکوپ نوری اجزاء مختلف باکتری مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

رنگ‌آمیزی گرم یکی از بهترین روش‌های رنگ‌آمیزی در میکروب‌شناسی بوده که به طور وسیع در آزمایشگاه میکروب‌شناسی مورد استفاده می‌باشد.

۲- **کشت:** برای مطالعه و تشخیص میکروب‌ها اغلب آن‌ها را می‌توان در محیط‌های مختلف کشت داد. کشت باکتری‌ها در موارد زیر بسیار مفید می‌باشد. موقعی که تعداد باکتری در نمونه کم باشد، هنگامی که تعداد زیادی از باکتری‌ها از نظر شکل ظاهری مشابه هم باشند، تعیین حساسیت یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تهیه آنتی‌ژن برای آزمایشات سرولوژیکی و تهیه واکسن.

۳- آزمایشات سرولوژیکی: برای تشخیص بیماری‌ها با بکارگیری سرم مشکوک و آنتی‌ژن معلوم خود باکتری و جستجوی آنتی‌ژن میکروب در مایعات بدن از آزمایشات سرولوژیکی استفاده می‌شود.

۳- **مطالعه خواص حیاتی باکتری‌ها:** برای تعیین هویت و تشخیص قطعی باکتری‌ها و بررسی مواردی مانند همولیز، تخمیر قندها، تولید اندول، تولید H_2S، تجزیه اوره و... از این روش‌ها استفاده می‌شود.

۴- **تلقیح به حیوان حساس آزمایشگاهی:** از این روش در شرایطی که تعداد باکتری در نمونه بسیار اندک بوده، عدم وجود محیط کشت مناسب برای رشد باکتری، تعیین شدت بیماری‌زایی، تهیه آنتی سرم‌های میکروبی استفاده می‌شود.

کوکسی‌های گرم مثبت

کوکسی‌های گرم مثبت مجموعه‌ای ناهمگون از باکتری‌ها که خصوصیات مشترک آن‌ها عبارتند از: شکل کروی، رنگ‌آمیزی گرم مثبت، عدم وجود اندوسپور، وجود یا عدم وجود فعالیت کاتالاز، (آزمایش کاتالاز روش ساده‌ای برای تقسیم‌بندی جنس‌های مختلف بوده و آنزیمی است که پراکسید هیدروژن را به آب و گاز اکسیژن تجزیه می‌کند و با افزودن یک قطره از محلول پراکسید از هیدروژن بر روی کلنی باکتری ایجاد حباب‌های گاز اکسیژن به دلیل تجزیه آن توسط باکتری است.)

- جنس‌های هوازی کاتالاز مثبت: استافیلوکوک، میکروکوک.
- جنس‌های هوازی کاتالاز منفی: استرپتوکوک، انتروکوک.

استافیلوکوک‌ها

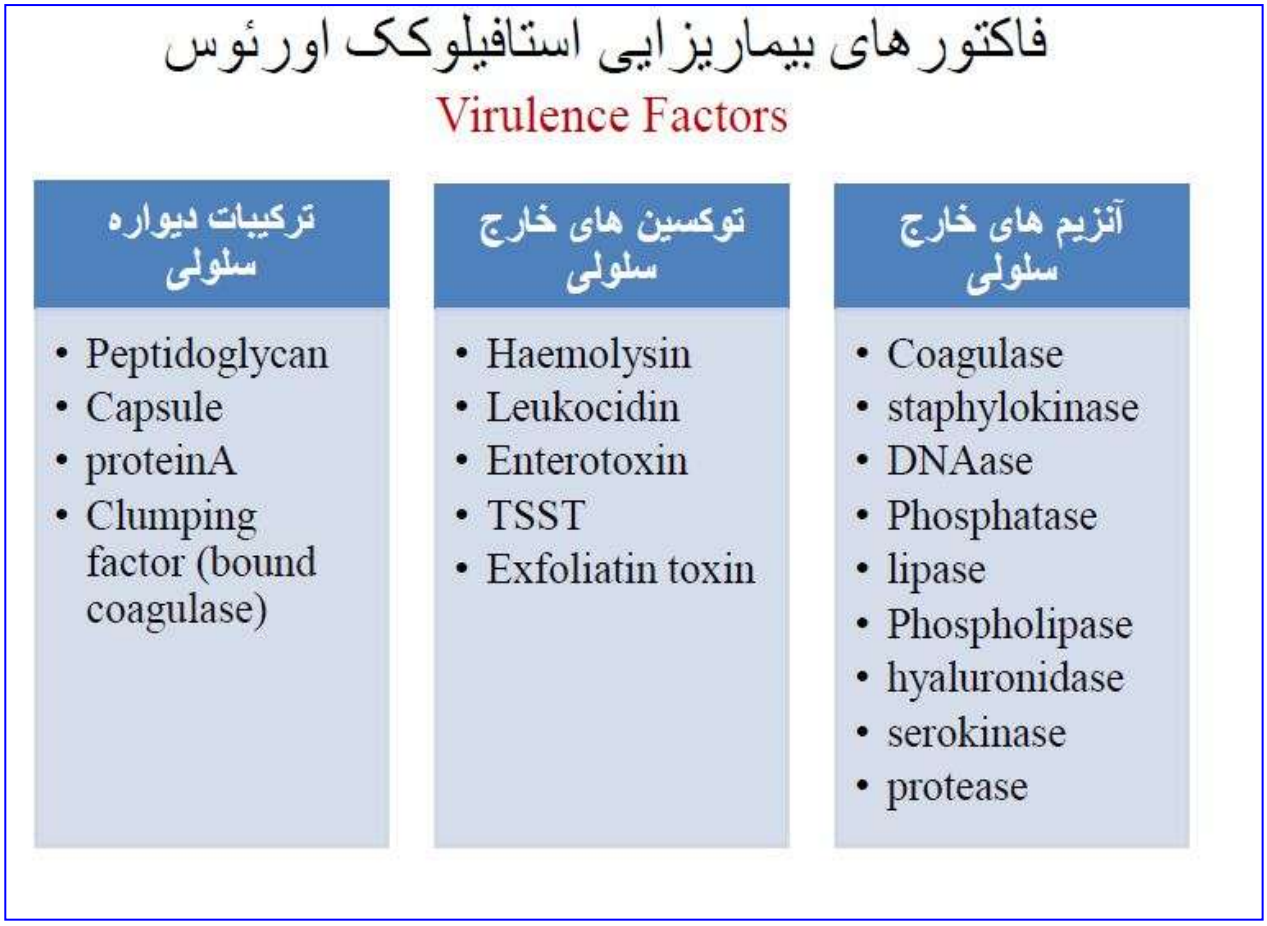
کوکسی‌های گرم مثبت، کروی و خوشه‌ای شکل، غیرمتحرک، کاتالاز مثبت، تحمل غلظت بالای نمک، فاقد تاژک.

سه گونه از استافیلوکوک‌ها در انسان ایجاد بیماری می‌کنند که عبارتند از:

استافیلوکوک ارئوس

استافیلوکوک ارئوس از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد.

ارگانیسمی که بیماری‌های مختلفی را از قبیل آبسه، عفونت‌های چرک‌زای گوناگون (اندوکاردیت و استئومیلیت)، مسمومیت غذایی و سندرم شوک توکسیک، زرد زخم، فولیکولیت را ایجاد می‌کند. باکتری کواگولاز مثبت بوده (کواگولاز آنزیمی که باعث فعال‌سازی پروترومبین و موجب لخته شدن پلاسما می‌گردد). تخمیر مانیتول و همولیز سلول‌های قرمز خون را موجب می‌شود.



تشخیص آزمایشگاهی

کشت نمونه بر روی محیط بلادآگار صورت گرفته در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه می‌شود از تهیه لام از کلنی‌های رشد یافته، رنگ‌آمیزی گرم برای مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت صورت می‌گیرد.

انجام آزمایش کواگولاز برای تعیین استافیلوکوک ارئوس از سایر استافیلوکوک‌ها ضروری است.

برای انجام آزمایش کواگولاز لوله‌ای مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از پلاسمای انسانی را با ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون محیط کشت مایع حاوی استافیلوکوک در لوله مخلوط نموده و به مدت ۳ تا ۶ ساعت در دمای ۳۷

درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. پس از این مدت محتویات لوله از نظر انعقاد بررسی می‌شود، استافیلوکوک کواگولاز مثبت می‌باشد.

کشت در محیط مانیتول سالت آگار که ایجاد رنگ زرد نشانه فرمانتاسیون مانیتول می باشد.

برای انجام تست DNase کشت بصورت خطی منفرد در قسمت میانی پلیت صورت می گیرد که با افزدون اسید کلریدریک نرمال ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی نشانه وجود استاف اروئوس است.

استافیلوکوک اپیدرمیس و استافیکوکوک ساپروفتیکوس

برخلاف استافیلوکوک اورئوس این دو کواگولاز منفی هستند.

استافیلوکوک اپیدرمیس بیشتر مرتبط با عفونت بیمارستانی بوده در صورتی که عفونت استافیلوکوک ساپروفتیکوس بیشتر جمعیت عادی را درگیر می‌کند.

اپیدرمیس بخشی از فلور طبیعی بدن انسان است و روی غشاء مخاط و پوست وجود داشته و در اثر کاربرد کاتترهای داخل وریدی یا پیوندهای مصنوعی از قبیل دریچه های قلبی و عروقی و مفاصل مصنوعی ایجاد عفونت می‌کند.

ساپروفتیکوس بیشتر عفونت مجاری اداری بخصوص در زنان و افراد با نقص سیستم ایمنی ایجاد می‌کند.

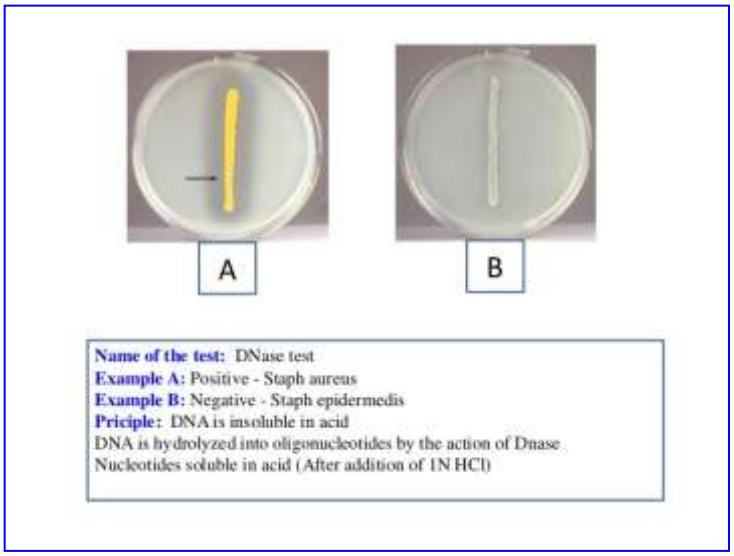
تشخیص آزمایشگاهی

نمونه: چرک آبسه، آبسه، زخم، محل سوختگی، خلط، خون، ادرار، مدفوع، پوست.

آزمایش مستقیم: تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی گرم، مشاهده کوکسی‌های گرم مثبت به صورت تکی یا خوشه‌ای.

کشت: بر روی محیط ژلوز ساده، بلاد آگار (خون گوسفند)

تست کو آگولاز: استافیلوکوک اورئوس کوآگولاز مثبت است.



جدول ۱

تست آزمایشگاهی	ا. اورئوس	ا. اپیدرمیس	ا. ساپروفتیکوس
کواگولاز	+	–	–
حساسیت به آنتی بیوتیک نووبیوسین	حساس	حساس	مقاوم
تولید اسید از تخمیر بی‌هوازی قند مانیتول	+	–	–
تست فسفاتاز	+	+	–
رشد در محیط حاوی نمک	+	–	–

استرپتوکوک

کوکسی‌های گرم مثبت به اشکال دوتایی یا زنجیره‌ای، کاتالاز منفی، بدون حرکت، بدون اسپور که برای رشد نیاز به محیط کشت‌های غنی شده دارد.

براساس طبقه‌بندی لانسفیلد استرپتوکوک‌ها به گروه‌های A، B، C، F و G تقسیم می‌شوند.

استرپتوکوک گروه A یا پیوژنز

عفونت‌های چرکی مانند فارنژیت، تب مخملک، راش ارتیماتوز منتشره، پیودرم (عفونت موضعی بـه همـراه وزیکول)، سلولیت، فاسیت، سندرم شوک سمی، سپسیس، تب روماتیسمی و گلومرولونفریت را ایجاد می‌کند.

استرپتوکوک گروه B یا آگالاکتیه

بیماری زودرس نوزادان مانند پنومونی و مننژیـت و سپسـیس، در بزرگسـالان پنومـونی عفونـت مفصـل و استخوان را ایجاد می‌کند.

استرپتوکوک گروه D یا انتروکوک

بیشتر در بیماران بستری در بیمارستان سبب عفونت دستگاه اداری شده که استفاده از سـوندهای اداری از عوامل متعدد کننده ابتلا به عفونت می‌باشد.

استرپتوکوک ویریدنس

عامل آبسه، سپسیس، آندوکادیت می‌باشد.

استرپتوکوک کوک پنومونیه

عمل عفونت حاد ریوی به همراه تب و لرز و سرفه‌های مداوم می‌باشد.

تشخیص آزمایشگاهی

استرپتوکوک گروه A

حساس به باسیتراسین، کاتالاز منفی، همولیز بتا، تولید استرپتولیزین S و O، آزمایش PYR مثبت

استرپتوکوک گروه B

هیدرولیز هیپورات، مقاوم به باسیتراسین، همولیز بتا، آزمایش CAMP مثبت

استرپتوکوک گروه D

همولیز آلفا، رشد در محیط صفرا، هیدرولیز اسکولین، رشد در محیط حاوی ۶/۵ درصد کلرید سدیم، مثبت بودن PYR، مقاوم به باسیتراسین

انتروکوک

کاتالاز منفی، PYR مثبت، مقاوم به املاح صفراوی و اپتوچین

استرپتوکوک پنومونیه

کوکسی‌های گرم مثبت بیضی شکل تیز (لانست شکل)، کپسول‌دار، زنجیره‌های کوچک یا جفت‌جفت (دیپلوکوک)، همولیز آلفا، حاوی آنزیم پنومولیزین، برای رشد در محیط‌های کشت نیاز به محیط‌های کشت‌های غنی شده دارد.

ظهور پنومونی یا ذات‌الریه اغلب ناگهانی همراه با تب و سرفه، خلط خونی و سپس عفونت گوش میانی و سینوس را موجب می‌شود.

تشخیص آزمایشگاهی

رنگ‌آمیزی گرم از نمونه خلط که به صورت دیپلوکوک‌های گرم مثبت لانست شکل با یک کپسول رنگ‌ناپذیر مشاهده می‌شود. انجام تست کوالانگ یا تست تورم کپسولی با افزودن آنتی بادی‌های پلی کلونال ضد کپسول با باکتری که توسط میکروسکوپ بررسی می‌شود.

کشت: نمونه خلط در محیط کشت غنی از نظر مواد غذایی حاوی خون کشت داده می‌شود.

آزمایش حل شدن در صفرا، حساسیت به اپتوچین (هاله عدم رشد بر روی بلاد آگار) نیز برای تشخیص پنوموکوک صورت می‌گیرد.

انتروکوک

کوکوس‌های روده‌ای به واسطه داشتن آنتی‌ژن گروه D در دیواره سلولی از سال ۱۹۸۴ در جنس جدیدی بنام انتروکوک طبقه‌بندی شدند که دارای ۴۰ گونه در این جنس می‌باشند.

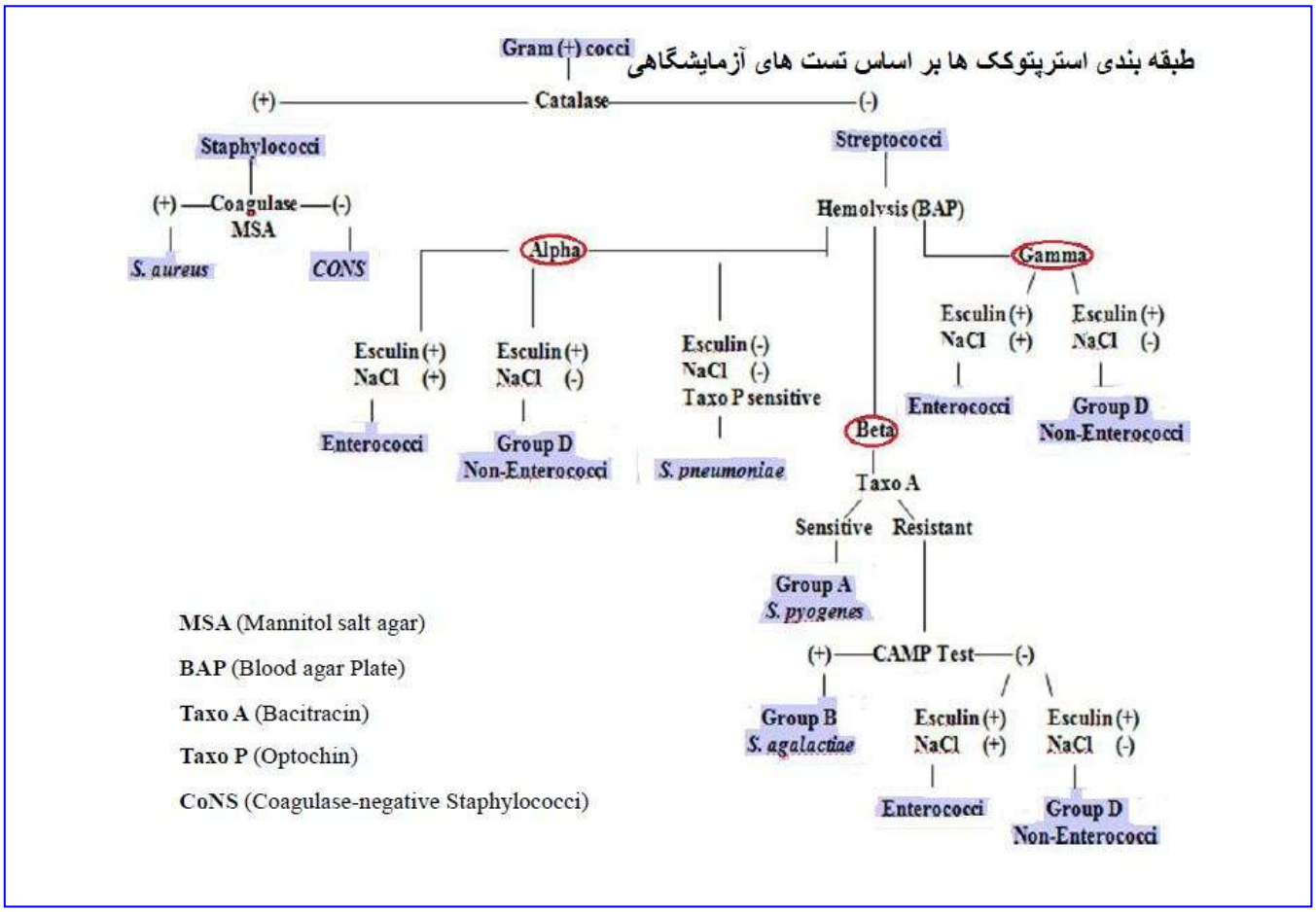
انتروکوک فیکالیس، انتروکوک فسیوم و گالیناروم از عوامل شایع کلونیزه شده در روده انسان بوده که مقاوم به ونکومایسین می‌باشند. باکتری بیشتر موجب عفونت‌های بیمارستانی می‌گردد.

تشخیص آزمایشگاهی

کوکوسی‌های گرم مثبتی که نظر مرفولوژی میکروسکوپی شبیه استرپتوکوک پنومونیه می‌باشند. توانایی رشد بین دمای ۱۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و گستره pH وسیع (۹/۹- ۴/۶)، رشد در حضور غلظت بالای کلرید سدیم و نمک‌های صفراوی می‌باشند.

در محیط‌های غیرانتخابی مانند بلادآگار و شکلات آگار رشد می‌کند. در رنگ‌آمیزی گرم بسیار شبیه پنوموکوک است و به توسط موارد زیر از پنوموکوک قابل جداسازی است.

تنها استرپتوکوکی که قادر به هیدرولیز PYR می‌باشد استرپتوکوک پیوژنز است.



جدول ۲

گونه	مقاومت به اپتوچین	حلالیت در صفرا	هیدرولیز PYR
پنوموکوک	حساس	+	-
انتروکوک	مقاوم	+	+

کوکسی‌های گرم منفی

از مهم ترین جنس کوکسی‌های گرم منفی، در خانواده نیسریاسیه قرار دارد که عبارتند از نیسـریا ایکـنلا و کینگلا، سایر جنس‌های این خانواده در انسان بیماری ایجاد نمی‌کند.

جنس نیسریا شامل ۲۸ گونه است که از آن‌ها ۱۰ گونه در انسان ردیابی شده و ۲ گونه آن‌ها بـه نـام‌هـای نیسریاگنوره و نیسریا مننژیستیدیس منحصراً در انسان بیماری ایجاد می‌کند.

انسان میزبان طبیعی این باکتری‌ها اسـت. دیپلوکـوک‌هـای گـرم منفـی فاقـد کپسـول، ولـی دارای پیلـی می‌باشند. باکتری حساس به شرایط محیط و مواد ضدعفونی کننده می‌باشد.

جدول ۳

گونه	ورود عفونت	کپسول پلی ساکاریدی	تخمیر مالتوز	واکسن
نایسریا مننژیتیدیس	دستگاه تنفس	+	+	+
نایسریاگنوره	دستگاه تناسلی	-	-	-

نیسریاگنوره

عفونت‌های ناشی از نیسریاگنوره چندین قرن است که شناخته شده و علی‌رغم درمان‌های مؤثر آنتی‌بیوتیکی، گنوره (سوزاک) یکی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که از طریق فعالیت جنسی منتقل می‌شود. وجود نیسریاگنوره در نمونه بالینی همیشه با اهمیت تلقی می‌شود، در حالی‌که نیسریا منتژیتیدیس بدون ایجاد بیماری در ناز وفارنکس افراد سالم می‌تواند کلونیزه شود. گونه‌های نیسریا، کوکوس‌های گرم منفی و هوازی به صورت دیپلوکوکوس که از سمت مقعر روبه‌روی هم قرار می‌گیرند (شبیه دانه‌های قهوه)، فاقد حرکت و اسپور، اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت بوده و همه گونه‌های نیسریا گنوره برای رشد به سیستین و منبع انرژی مانند گلوکز و پیروات و لاکتات نیاز دارند قادر به رشد به روی محیط بلاد آگار نبوده ولی بر روی محیط شکلات آگار (محیط غیرانتخابی) در حرارت ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه CO_2 کلنی ایجاد می‌کنند. کشت در محیط‌های انتخابی مانند محیط تایرمارتین اصلاح شده، صورت می گیرد.

سویه‌های بیماری‌زا و غیربیمارزا دارای پیلی بوده که در بیماری‌زایی مؤثر است.

تشخیص آزمایشگاهی

پس از تهیه نمونه بتوسط سواپ از مجاری ادراری در مردان علامت‌دار و رنگ‌آمیزی گرم مشاهده پلی مورفونوکلئورها به همراه کوکسی‌های گرم منفی بسیار اختصاصی است. در زنان استفاده از رنگ‌آمیزی گرم به تنهایی کافی نبوده و کشت نیز باید صورت گیرد.

کشت حساسیت و ویژگی بسیار بالایی داشته اما انجام تست‌های مولکولی به جای کشت جهت تشخیص روش بسیار مؤثرتری است.

کشت در محیط تایرمارتین که نوعی محیط شکلات آگار حاوی آنتی بیوتیک‌های وانکومایسین، کولیستین، تری متوپریم و نیستاتین به همراه ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد. انجام تست اکسیداز صورت گرفته و همچنین انجام تست الایزا نیز در تشخیص مؤثر است.

نیسریا منتژیتیدیس

منتژیت به همراه سردرد و تب که گاهاً موجب پنومونی، آرتریت و التهاب مجرای ادراری می‌شود. نیسریا منتژیتیدیس را می‌توان به راحتی در مایع مغزی نخاعی (CSF) بیماران مبتلا به منتژیت مشاهده نمود. کشت در محیط شکلات آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 بیشترین رشد را دارد.

باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار

باسیل‌های گرم مثبت تشکیل‌دهنده اسپور، شامل گونه‌های باسیلوس وکلستریدیوم می‌باشد. این باسیل‌ها در همه جا یافت شده و به دلیل تشکیل اسپور می‌توانند برای سالیان متمادی در محیط باقی بمانند. گونه‌های باسیلوس هوازی ولی انواع کلستریدیوم بی‌هوازی هستند.

گونه‌های باسیلوس

گونه‌های باسیلوس شامل باکتری‌هایی است با اندازه بزرگ، غیرمتحرک، هوازی، گرم مثبت و میله‌ای شکل دارای انتهاهای چهارگوش که به صورت زنجیر پشت سر هم قرار می‌گیرند. برخی از اعضا این گروه مانند باسیلوس سرئوس و باسیلوس سابتیلیس به صورت ساپروفیت در خاک و آب و سبزیجات یافت می‌شود. اسپور در این باکتری‌ها مرکزی است.

باسیلوس سرئوس با تولید سم (انتروتوکسین) موجب مسمومیت غذایی شده، باسیلوس آنتراسیس به دلیل ایجاد سیاه زخم پاتوژن عمده این جنس محسوب می‌شود.

باسیلوس آنتراسیس

عامل بیماری سیاه‌زخم، به طور عمده بیماری علفخوارانی مانند گوسفند، گاو و اسب است. عفونت در انسان به صورت تصادفی و در اثر تماس با محصولات حیوانات آلوده و یا تماس با حیوانات آلوده صورت می‌گیرد. اسپورهای موجود در خاک از طریق خار و یا آسیب ایجاد شده در پوست، دهان و دستگاه گوارش وارد بدن حیوانات علفخوار شده و در انسان معمولاً عفونت از راه ورود اسپور از طریق پوست آسیب دیده (سیاه‌زخم

پوستی) یا به ندرت از طریق غشاهای مخاطی (سیاه‌زخم گوارشی) و یا به وسیله استنشاق اسپورها (سیاه‌زخم تنفسی) ایجاد می‌شود. در انسان ۹۵ درصد موارد را سیاه‌زخم پوستی و ۵ درصد را نوع تنفسی تشکیل می‌دهد. سیاه‌زخم گوارشی بسیار نادر است.

تشخیص آزمایشگاهی

باسیل‌ها درشت گرم مثبت با اسپور مرکزی در نمونه مورد آزمایش با رنگ‌آمیزی گرم از نمونه زخم یا خون، چرک یا خلط مشاهده می‌شود.

کشت در محیط بلاد آگار به صورت کلنی‌های سفید مایل به خاکستری رنگ، غیرهمولیتیک با بافتی خشن با منظره‌ای شبیه شیشه شکسته ایجاد می‌کند. در حالت رشد بیش از حد کلنی حالتی به نام سرمدوزا (Medusa head) دیده می‌شود.

تشخیص و درمان عفونت های باسیلوس آنتراسیس

Characteristic	*Bacillus anthracis*	Other *Bacillus* spp.
همولیز	منفی	مثبت
حرکت	منفی	مثبت
هیدرولیز ژلاتین	منفی	مثبت
تخمیر سالیسین	منفی	مثبت

- تشخیص بر اساس کشت و جداسازی باکتری از نمونه های بالینی + رنگ آمیزی گرم + کلنی های همولیز منفی و شبیه شیشه ی خرد شده یا Medusa + غیر متحرک + حساس به پنی سیلین (واکنش زنجیره ای مروارید) + لیز با فاژ گاما
- درمان بر اساس تجویز سیپروفلوکساسین است
- واکسیناسیون دام و حیوانات اهلی با واکسن سوش زنده فاقد کپسول
- افرادی که در معرض خطرند باید توسط واکسن حاوی آنتی ژن محافظت کننده (PA) واکسینه شوند .

باسیل سرئوس

این باکتری موجب ایجاد مسمومیت غذایی به دو صورت می‌گردد:

۱) نوع استفراغی در اثر خوردن غذاهای برنجی

۲) نوع اسهالی که به دنبال خوردن غذاهای گوشتی و سوسیس ایجاد می‌شود. باسیلوس سرئوس ارگانیسم ساکن خاک است که برنج را آلوده می‌کند.

تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص آزمایشگاهی آن مشابه باسیلوس آنتراسیس بوده که با کشت نمونه‌های استفراغی یا مدفوع صورت می‌گیرد.

کلستریدیوم

باسیل‌های متحرک، گرم مثبت بزرگ و بی‌هوازی که زیستگاه طبیعی آن‌ها خاک، دستگاه گوارشی حیوانات و انسان می‌باشد. بیماری‌هایی نظیر بوتولیسم، کزاز، گانگرن گازی و کولیت با غشای کاذب ایجاد می‌کنند. اسپور معمولاً قطری بیشتر از باسیل داشته، اسپور می‌تواند در مرکز یا نزدیک به انتها باشد. باکتری به دلیل داشتن فلاژل پری تریش متحرک هستند.

کلستریدیوم بوتولینوم

عامل بیماری بوتولیسم با انتشار جهانی است و عمدتاً در خاک و مدفوع حیوانات یافت می‌شود. اسپور باکتری نسبت به گرما مقاوم بوده و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت یک ساعت تحمل می‌کند.

عامل بوتولیسم با فلج شل که در اثر تولید نوروتوکسین از آزادسازی نوروترانسمتیر استیل کولین ممانعت می‌کند براساس تفاوت‌های آنتی ژنی و نوع توکسین به ۸ تیپ مختلف A تا G تقسیم‌بندی می‌شود. تیپ‌های F، E، B و A در انسان ایجاد بیماری می‌کند. تیپ‌های C و D در حیوانات بیماری‌زا هستند.

تشخیص آزمایشگاهی

توکسین باکتری معمولاً در سرم بیماران یا بقایای مواد غذایی قابل ردیابی است. بوتولیسم نوزادان کلستریدیوم بوچولینوم بوده و توکسین آن را می‌توان در محتویات روده نه در سرم تشخیص داد.

وجود توکسین با استفاده از روش‌های هماگلوتیناسیون پاسیو یا رادیوایمونواسی تأیید می‌شود.

از محیط‌های انتخابی EYA و CBI برای ایزوله کلستریدیوم بوتولینوم استفاده می‌شود.

کلستریدیوم تتانی

عامل بیماری کزاز (تتانوس) در خاک و مدفوع اسب و سایر حیوانات وجود دارد. باکتری یک نوع نوروتوکسین به نام تتانواسپاسمین حساس به حرارت تولید کرده که مانع از آزادسازی نوروترانسمیترهایی مانند گاما آمینو بوتیریک اسید و گلایسین در سیناپس عصبی می‌شود.

تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص این بیماری براساس تظاهرات بالینی و سابقه وجود زخم صورت می‌گیرد.

کشت از بافت‌های حاصل از زخم‌های آلوده صورت گرفته که می‌توان کلستریدیوم تتانی را تشخیص داد. وجود توکسین به کمک خنثی‌سازی توکسین با آنتی توکسین اختصاصی بررسی می‌شود.

کلستریدیوم پرفرینجنس (باسیل ولشای)

باکتری در محیط و روی پوست به فراوانی وجود دارد. در صورت ورود باکتری به بافت‌های آسیب‌دیده، عفونت‌های تهاجمی مانند میونکروز و گانگری گازی ایجاد می‌کند. حدود ۳۰ گونه از کلستریدیوم می‌توانند چنین اثری ایجاد کنند. برخی از سویه‌های کلستریدیوم پرفرینجنس خصوصاً در اثر مصرف مواد غذایی گوشتی که بر روی آن‌ها رشد کنند، با تولید انتروتوکسین قوی در عرض ۱۸-۶ ساعت موجب تحریک روده و اسهال می‌شوند. باکتری همچنین می‌تواند موجب سلولیت و فاسلیت گردد.

تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص باید خیلی سریع صورت گیرد مواد حاصل از زخم، چرک و بافت در رنگ‌آمیزی با رنگ‌آمیزی گرم وجود باسیل‌های گرم مثبت درشت به همراه اسپور بیضی شکل مرکزی یا انتهایی مشاهده می‌شود.

کشت باکتری در محیط‌های حاوی گلوکز و گوشت چرخ کرده (Chopped- meat)، تایوگلیکولات حاوی خون در شرایط بی‌هوازی کشت داده می‌شوند. با انتقال کلنی‌های ایجاد شده در هر یک از محیط‌های ذکر شده به داخل محیط شیر به دلیل داشتن لستیناز ایجاد لخته (تخمیر طوفانی شیر) به همراه تولید گاز در عرض ۲۴ ساعت نشانگر کلستریدیوم پرفرینجنس می‌باشد. انجام تست قندها، همولیز، بررسی فعالیت لستینازی از محیط حاوی زرده تخم‌مرغ استفاده می‌شود. باکتری روی محیط بلاد آگار ایجاد همولیز دوگانه می‌کند. تست ناگلر نیز در تشخیص مهم می‌باشد.

کلستریدیوم دیفیسیل

این باکتری موجب کولیت با غشاء کاذب به توسط تولید سم باکتری، در اثر معرف آنتی بیوتیک به مدت طولانی (مانند آمپی سیلین و کلیندامایسین) می‌کند. این باکتری از ارگانیسم‌های فلور طبیعی روده است.

دارای توکسین A (انتروتوکسین) و توکسین B (سایتو توکسین) بوده که از فاکتورهای بیماری‌زایی باکتری می‌باشد.

تشخیص آزمایشگاهی

براساس تعیین وجود سایتو توکسین یا انترو توکسین باکتری در نمونه مدفوع بوده و به کمک آنتی‌بادی‌های اختصاصی مهارکننده تخریب سلولی، وجود اگزوتوکسین در نمونه مدفوع تأیید می‌شود.

باسیل‌های گرم مثبت بدون اسپور

لیستریا

باسیل‌های گرم مثبت بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور بوده، جنس لیستریا دارای ۱۰ گونه می باشد. گونه‌های مونوسیتوژنز و ایوانوی تنها پاتوژن‌های شناخته شده می‌باشند.

لیستریا مونوسیتوژنز از پاتوژن‌های مهم انسانی و لیستریا ایوانوی پاتوژن حیوانی است.

باکتری فلور طبیعی دستگاه گوارش بسیاری از حیوانات بوده و سبب افزایش تعداد مونوسیت‌ها در خرگوش می‌شود. لیستریا در گستره دمایی ۱ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و غلظت بالای نمک به خوبی رشد می‌کند.

این باکتری در دمای اتاق متحرک اما در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحرک آن کم می‌شودو

حرکت باکتری در محیط مایع در زیر میکروسکوپ حرکتی شبیه ملق زدن (Tumbling) با غلت زدن دارد. قراردادن محیط‌های کشت در حرارت اتاق باکتری در محیط کشت به حالت چتری رشد می‌کند که به دلیل حرکت باکتری می‌باشد. این ارگانیسم در حیوانات، گیاهان و خاک سراسر دنیا دیده می‌شود که از طریق تماس با حیوانات یا مدفوع آن‌ها، شیر پاستوریزه نشده و سبزیجات آلوده به انسان منتقل می‌شود. عفونت در خانم‌های باردار در سه ماهه سوم به واسطه کاهش ایمنی سلولی موجب انتقال عفونت به جنین عقب‌ماندگی ذهنی در جنین، سقط، زایمان زودرس، مننژیت در بزرگسالان با نقص ایمنی مانند افراد سرطانی و افراد پیوند عضو می‌گردد. لیستریوز به علت خوردن مواد غذایی آلوده صورت می‌گیرد.

تشخیص آزمایشگاهی

رنگ‌آمیزی اسمیرهای مایع مغزی نخاعی (CSF) و مشاهده باسیل‌های گرم مثبت صورت می‌گیرد. کشت روی بلاد آگار و استفاده از روش غنی‌سازی در سرما (Cold enrichment)، بررسی همولیز بتا در محیط بلاد آگار (خون گوسفند)، انجام تست CAMP که در لیستریا مثبت است.

اریزیپلوتر کیس روزیوپاتیه

این جنس دارای سه گونه بوده که اریزیپلوتریکس روزیوپاتیه عامل بیماری در انسان است. بیماری در انسان عمدتاً به شکل عفونت پوستی موضعی یا سپتیسمی همراه با اندوکاردیت می‌باشد. باکتری به شکل باسیل گرم مثبت بدون اسپور و بی‌هوازی اختیاری است گاهی دارای پلی مورفیسم (چند شکلی) که به سرعت بی‌رنگ شده و به صورت گرم منفی درمی‌آید.

تشخیص آزمایشگاهی

به دلیل این‌که باکتری در بافت‌های عمیق ضایعه وجود دارند، نیاز به تهیه نمونه‌های بیوپسی کاملاً ضخیم و اسپیراسیون عمقی دارد. باکتری کاتالاز منفی و فاقد حرکت است. در محیط TSI تولید سولفید هیدروژن کرده و در حضور ۱۰-۵ درصد CO_2 رشد بهتری دارد.

کورینه باکتریوم

باسیل‌های گرم مثبت هوازی، دارای اشکال چماقی و اشکال نامنظم (پلی مورف) بوده و دارای بیش از ۱۰۰ گونه و زیرگونه می‌باشند. دیواره سلولی آن‌ها دارای آرابینوز، گالاکتوز، مزودی آمینو پیملیک اسید و مایکولیک اسید می‌باشد. باکتری هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، غیرمتحرک، کاتالاز مثبت است.

از مهم‌ترین نوع بیماری‌زا در انسان کورینه باکتریوم دیفتریه (عامل دیفتری) است. باکتریی مخزن حیوانی نداشته و در انسان ایجاد دیفتری می‌کند.

مهم‌ترین فاکتور ویرولانس، توکسین دیفتری است این توکسین ساختار A-B داشته و از سنتز پروتئین ممانعت می‌کند. بیماری انتشار جهانی داشته و در پوست و مجاری مستقر شده و از فردی به فرد دیگر توسط قطرات تنفسی انتقال می‌یابد.

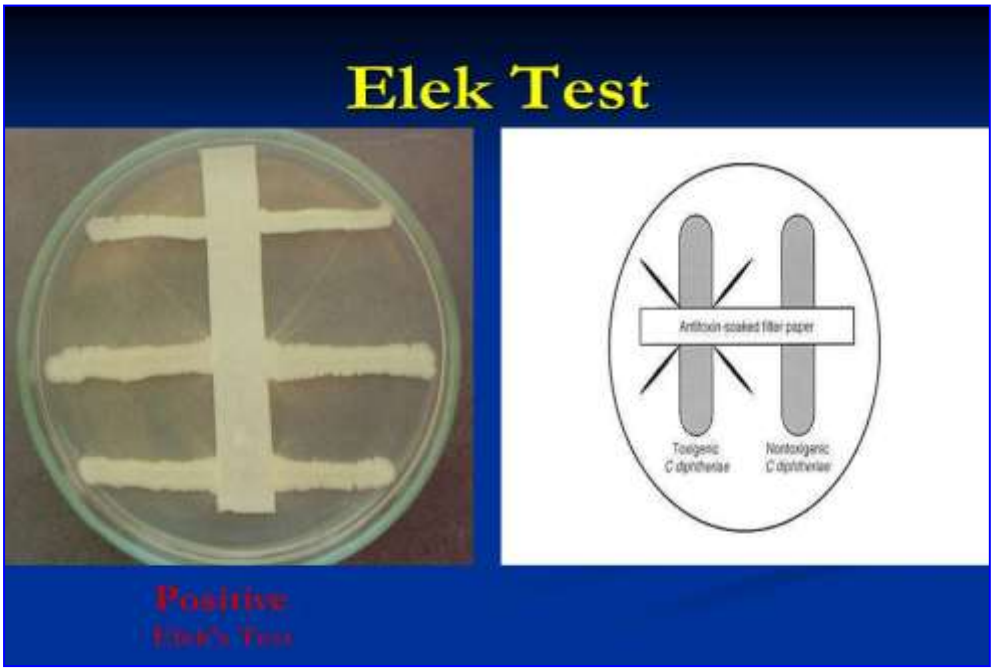
تشخیص آزمایشگاهی

توجه علائم بالینی بیمار حائز اهمیت بوده و مشاهده پرده کاذب در گلو در تشخیص مهم است. به توسط سواب از گلو بیمار نمونه گرفته شده و با رنگ‌آمیزی آلبرت و گرم صورت می‌گیرد.

روش میکروسکوپی غیراختصاصی است، گرانول‌های متاکروماتیک در کورینه باکتریوم دیفتریه و سایر کورینه باکتریوم‌ها دیده می‌شود.

کشت روی محیط غیرانتخابی مانند بلاد آگار و محیط انتخابی مانند سیستئین- تلوریت آگار و محیط تینسیدال و کلیستین نالیدیسیک آگار ولوفر انجام می‌گیرد.

انجام تست الک Elek مفید است. (تست الک برای بررسی تولید اگزوتوکسین توسط باکتری انجام می‌شود)



نوکاردیا

باسیل‌های گرم مثبت هوازی، که به دلیل داشتن اسید مایکولیک در دیواره سلولی، اسید فاست ضعیف هستند. در بافت‌ها و کشت رشته‌های منشعب مشابه هایف‌های حاصل از کپک تولید می‌کنند.

نوکاردیا بیماری ریوی، مایستوما، بیماری جلدی- لنفاوی، سلولیت و آبسه‌های زیرجلدی و آبسه مغزی ایجاد می‌کند.

تشخیص آزمایشگاهی

نمونه از خلط یا آبسه بیماران تهیه شده و روش میکروسکوپی برای مشاهده ارگانیسم منشعب و اسید فست نسبی بیمار کمک‌کننده است. سرعت رشد در محیط کشت کند بوده به انکوباسیون یک هفته‌ای نیاز دارد. محیط اختصاصی مانند BCYE برای جداسازی نوکاردیا از سایر باکتری‌ها مفید است. رشد در حضور ۱۰-۵ درصد CO_2 بهتر صورت می‌گیرد.

مایکو باکتریوم

جنس مایکوباکتریوم شامل باسیل‌های هوازی، غیرمتحرک و بدون اسپور، دیواره سلولی آن‌ها غنی از موم یا Wax که سبب پیدایش سطح هیدروفوبیک و مقاومت در برابر عوامل ضدعفونی‌کننده می‌باشد.

مایکوزئیدهای اختصاصی یا فاکتور طنابی شدن cord factor باعث چسبیدن باکتری‌ها به همدیگر شده و از عوامل ویرولانس باکتری می‌باشد.

مایکوباکتریوم‌ها اسید فاست (اسید پایدار) بوده و به دلیل داشتن ساختار دیواره سلولی پیچیده از نظر نیاز غذایی باکتری پرنیاز هستند، رشد بسیار آهسته داشته و نیاز به ۸ هفته زمان جهت رشد در محیط‌های کشت آزمایشگاهی دارند. در حال حاضر ۱۵۰ گونه مایکوباکتریوم شناخته شده که بسیاری از آن‌ها در انسان بیماری‌زاست.

از گونه‌های مهم بیماری‌زا در انسان، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (عامل سل)، مایکوباکتریوم لپره (عامل جذام)، مایکوباکتریوم اویوم کمپلکس، مایکوباکتریوم کانزاسی، فورتیتوم، چلونه و آویوم می‌باشد. ساختار اصلی دیواره اصلی دیواره سلولی مایکوباکتریوم‌ها همانند دیواره سلولی اختصاصی باکتری‌های گرم مثبت است و شامل یک غشا سیتوپلاسمی داخلی به همراه لایه ضخیم پپتدوگلیکان و بدون غشا خارجی است.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

عامل بیماری سل از طریق قطرات تنفس منتقل شده و یک پاتوژن درون سلولی با توانایی ایجاد یک عفونت پایدار می‌باشد. در هنگام آلودگی ذرات عفونی ریز به آلوئول‌ها دستگاه تنفسی نفوذ کرده و در آن‌جا توسط ماکروفاژها فاگوسیته می‌شوند.

تنها مخزن طبیعی این بیماری انسان است تقریباً یک سوم جمعیت جهان دچار عفونت با مایکرو باکتریوم توبرکلوزیس می‌باشند.

تشخیص آزمایشگاهی

رنگ‌آمیزی اسید فاست (زیل نلسون) از نمونه خلط و برای تشخیص سریع‌تر از رنگ‌آمیزی اورامین استفاده می‌شود.

تست پوستی توبرکلولین و تست رهایی اینترفرون گاما، بررسی میکروسکوپی باکتری پس از رنگ‌آمیزی اسید- فاست بکار می‌رود، در رنگ‌آمیزی با گرم، باکتری گرم مثبت ضعیف می‌باشد.

کشت بر روی محیط‌های لون اشتاین (حاوی تخم‌مرغ و گلیسیرین و نشاسته سیب‌زمینی و رنگ سبز مالاشیت)، محیط دورسه، محیط مایع BACTEC صورت می‌گیرد. نمونه‌های کشت باید به مدت ۸ هفته نگهداری شوند.

مایکوباکتریوم لپره

بیماری جذام یا هانسن توسط مایکوباکتریوم لپره ایجاد می‌شود دوره کمون بسیاری طولانی بوده و علائم تا ۲۰ سال پس از عفونت ممکن است ظاهر شود.

تشخیص آزمایشگاهی

باسیل گرم مثبت ضعیف و اسید فاست قوی، روش میکروسکوپی روشی حساس بوده، انجام تست‌های پوستی نیز بسیار مفید هستند. در این بیماری کشت انجام نمی‌گیرد، زیرا محیط کشت مناسب برای رشد این باکتری وجود ندارد.

تهیه نمونه به توسط خراشیدن ضایعات پوستی مانند لاله گوش یا مخاط بینی تهیه می‌گردد.

باسیل‌های گرم منفی

انتروباکتریاسیه

خانواده انتروباکتریاسیه بزرگ‌ترین و ناهمگون‌ترین مجموعه از باسیل‌های گرم منفی مهم در پزشکی است. این خانواده بیش از ۴۰ جنس، صدها گونه و ریزگونه دارد. انتروباکتریاسیه ارگانیسم‌هایی که در همه جا وجود داشته در خاک، آب، روده حیوانات و انسان یافت می‌شوند.

برخی از آن‌ها مانند سالمونلا سروتیپ تیفی، گونه‌های شیگلا، یرسیناپستیس همیشه بیماری‌زا بوده در حالی‌که برخی دیگر مانند اشریشیاکلی، کلبسیلاپنومونیه و پرتئوس میرابلیس به عنوان فلور طبیعی کومنسال در بروز عفونت‌های فرصت‌طلب نقش دارند.

برخی از آن‌ها متحرک بوده، فاقد اسپوراند، در محیط‌های غیرانتخابی مانند بلاد آگارد و محیط‌های انتخابی مانند مک کانکی آگار به سرعت رشد کرده، گلوکز را تخمیر کرده و نیترات را احیا می‌کند. کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی‌اند.

گونه‌های تخمیرکننده لاکتوز: اشریشیا، کلبسیلا، انتروباکتر، سیتروباکتر و سراشیا.

گونه های غیرتخمیر کننده لاکتوز: پروتئوس، سالمونلا، شیگلا، یرسینیا.

برخی دارای کپسول‌اند مانند کلبسیلا، انتروباکتر و اشریشیا

دسته‌بندی اپیدمیولوژیک (سرولوژیک) انتروباکتریاسیه براساس سه گروه مهم و عمده از آنتی‌ژن‌ها صورت می‌گیرد که عبارتند از: پلی ساکارید پیکره‌ای O، آنتی‌ژن‌های K کپسولی، پروتئین فلاژلی H.

لازم به ذکر است که آنتی‌ژن O به عنوان آنتی‌ژن اختصاصی در هر جنس مطرح است. اکثر انتروباکتریاسیه متحرک بوده به جز کلبسیلا، شیگلا و یرسینیا.

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

جدول IMViC جهت تشخیص انتروباکتریاسیه ها

اشریشیاکلی

شایع‌ترین و مهم‌ترین گونه در جنس اشریشیا که در پزشکی اهمیت دارد. این ارگانیسم عامل چندین بیماری از قبیل سپسیس، عفونت مجاری اداری، مننژیت و گاستروانتریت می‌باشد.

سویه‌های اشریشیاکلی عامل گاستروانتریت به ۵ گروه اصلی تقسیم می‌شوند که عبارتند از:

انتروتوکس ژنتیک، انتروپاتوژنیک، انترواگرکتیو، انتروهموراژیک. انتروااینویسیو.

تشخیص آزمایشگاهی

کشت در محیط ژلوز ساده و محیط مک کانکی و یا EMB صورت گرفته، برخی از انواع در محیط کشت EMB دارای جلای فلزی می‌باشد. به دلیل تخمیر لاکتوز توسط باکتری کلنی‌های صورتی رنگ ایجاد می‌شود. به کمک محیط‌های افتراقی برخی از واکنش‌ها مانند تولید گاز، عدم تولید H_2S، ایجاد رنگ زرد در اثر اسیدی شدن محیط در تشخیص می‌توان استفاده نمود.

سالمونلا

طبقه‌بندی تاکسونومیک جنس سالمونلا مشکل بوده، مطالعه همولوژی DNA نشان می‌دهد که اکثر ایزوله‌های مهم از نظر بالینی متعلق به گونه سالمونلا انتریکا است.

سالمونلا تقریباً در تمامی حیوانات (طیور، خزندگان، چارپایان، جوندگان و دام‌های اهلی) وجود داشته ولی در پرندگان و انسان کلونیزه می‌گردد. انتشار باکتری از حیوان به حیوان توسط مواد غذایی آلوده به سالمونلا صورت می‌گیرد. حیوانات مخزن باکتری بوده و سروتیپ‌هایی مانند سالمونلا تیفی و سالمونلا پاراتیفی با انسان سازگار شده و بیماری ایجاد می‌کند. سایر سویه‌های سالمونلا مانند سالمونلا کلراسوئیس در حیوانات بیماری ایجاد می‌کند.

سویه‌هایی که تطابق بسیار با انسان دارند مانند سالمونلا تیفی و سالمونلا پاراتیفی می‌توانند در کیسه صفرا زنده مانده و منجر به بروز ناقلین مزمن گردند.

بروز بیشتر بیماری در کودکان زیر ۵ سال و بزرگسالان بالای ۶۰ سال و بیشتر در ماه‌های تابستان و پاییز رخ می‌دهد.

مهم‌ترین مخازن بیماری برای انسان طیور. تخم‌مرغ و لبنیات می‌باشد.

باکتری سالمونلا چهار نوع عفونت ایجاد می‌کند که عبارتند از: گاستروآنتریت. سپتی سمی، تب روده‌ای و کلونیزاسیون بدون علامت.

سالمونلا تیفی بیماری تب‌دار ایجاد کرده که تب تیفوئید نامیده می‌شود و شکل خفیف‌تر این بیماری به نام تب پاراتیفوئید که توسط سالمونلا پاراتیفی A، شوتمولری ایجاد می‌شود.

تشخیص آزمایشگاهی

باکتری قادر به تخمیر لاکتوز نبوده ولی H_2S (سولفید هیدروژن) تولید می‌کند، این دو مشخصه مهم شناسایی باکتری می‌باشد. همچنین از تست ویدال برای تشخیص استفاده نمود.

شیگلا

در این جنس ۴ گونه (و بیش از ۵۰ سرو گروه بر پایه آنتی O) شناسایی شده که عبارتند از:

۱- شیگلا دیسانتریه

۲- شیگلا بویدی

۳- شیگلا فلکسنری

۴- شیگلا بویدی

شیگلا با تهاجم و تکثیر در سلول‌های لایه مخاطی کولون بیماری ایجاد می‌کند. شیگلا دیسانتریه، اگزوتوکسینی به نام توکسین شیگلا (همانند توکسین تولید شده توسط EHEC) تولید می‌کند.

انسان تنها مخزن شیگلا می‌باشد. وجود تب و کرامپ‌های شکمی، اسهال و خون در مدفوع از علائم بیماری می‌باشد

تشخیص آزمایشگاهی

باکتری قادر به تخمیر لاکتوز و تولید H_2S و تولید گاز در محیط نبوده و کلنی‌های بی‌رنگ در محیط مک کانکی ایجاد می‌کند. تشخیص قطعی گونه‌های شیگلا و تعیین گروه با آزمایشات آگلوتیناسیون صورت می‌گیرد. رنگ‌آمیزی نمونه مدفوع با متیلن بلو و مشاهده سلول‌های PMN در تشخیص بیماری کمک‌کننده است.

جدول ۴

گونه	H_2S	گاز	تغییر pH
اشریشیا- کلبسیلا	-	+	اسیدی (پایین و بالای لوله)
شیگلا	-	-	پایین لوله اسیدی، بالای لوله قلیایی
سالمونلا	+	+	پایین لوله اسیدی، بالای لوله قلیایی

* واکنش‌های محیط آگار، آهن- قندهای سه‌گانه (TSI)

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه مدفوع

الف- بررسی ماکروسکوپی

نمونه‌های مدفوع باید از نظر ظاهر بررسی گردند و از نظر وجود لخته خون، موکوس و قوام مدفوع مشاهدات ثبت شوند.

ب- بررسی میکروسکوپی

با تهیه اسمیر نازک از مدفوع و رنگ‌آمیزی گرم می‌توان وجود گلبول‌های سفید، همچنین غالب بودن یک مورفولوژی باکتریایی، وجود سلول‌های مخمر یا عدم وجود باسیل‌های گرم منفی روده‌ای را در مدفوع تعیین نمود.

انتخاب، تلقیح و انکوباسیون محیط‌های کشت مدفوع

الف- انتخاب محیط‌های کشت

۱) محیط‌های پلیتی افتراقی و انتخابی:

برای کشت روتین مدفوع، جهت جداسازی باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای باید از محیط‌های افتراقی و انتخابی زیر استفاده شود:

محیط MacConkey Agar (MAC) که همه باسیل‌های گرم منفی روده‌ای بتوانند روی آن رشد کنند، همراه با محیط افتراقی- انتخابی Xylose- Lysine Decarboxylate (XLD).

(از محیط Hektoen Enteric Agar (HE) هم می‌توان به جای XLD استفاده نمود.)

تذکر:

a) محیط SS (Salmonella Shigella Agar) برای جداسازی سالمونلا به کار می‌رود، اما باعث مهار رشد برخی از گونه‌های شیگلا می‌شود. لذا نباید از این محیط در موارد مشکوک به جداسازی شیگلا به جای MAC، XLD یا HE استفاده نمود.

b) محیط XLD چون میزان مهارکنندگی کمتری روی رشد کلی فرم‌ها دارد، برای جداسازی شیگلا مناسب‌تر از محیط HE می‌باشد.

۲) محیط‌های مایع غنی‌کننده:

استفاده از این محیط‌ها به منظور بازیافت مقادیر کم سالمونلا یا شیگلا در افراد بدون علامت ناقل، و به‌ویژه در میان کارکنان دارای مشاغل حساس (مانند افراد شاغل در مهدهای کودک، آشپزخانه‌ها و...) الزامیست.

رایج‌ترین این محیط‌ها GN (Gram Negative Broth) براث و SF (Selenite F Broth) براث می‌باشد.

تذکر:

a) محیط SF براث برای جداسازی سالمونلا مناسب است، ولی برای برخی از گونه‌های شیگلا دارای اثر مهارکنندگی بوده، لذا بهتر است در موارد مشکوک به جداسازی شیگلا از این محیط استفاده نشود. استفاده از GN براث به دلیل خاصیت مهارکنندگی کمتر برای گونه‌های سخت رشد شیگلا، ارجحیت دارد.

b) هنگام ساخت محیط SF براث، حرارت دادن بیش از اندازه باعث ایجاد ذراتی در محیط می‌شود که در این صورت نمی‌توان از آن استفاده کرد. همچنین عملکرد محیط SF براث در شرایط بی‌هوازی بهتر می‌باشد، بنابراین مقدار محیط در لوله باید به اندازه‌ای باشد که حداقل ۵ سانتی‌متر عمق ایجاد شود.

ب- تلقیح محیط‌های کشت و انکوباسیون

نمونه‌های مدفوع پس از تحویل به آزمایشگاه باید فوراً بر روی محیط‌های ذکر شده کشت داده شوند.

۱- تلقیح محیط‌های پلیتی:

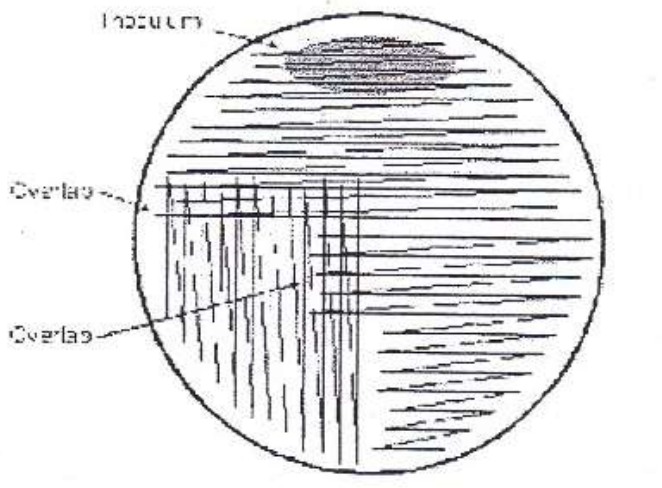
در صورتی که نمونه سوآب رکتال باشد، سوآب را روی سطح پلیت به قطر حدود ۲/۵ سانتی‌متر می‌چرخانیم. سپس سطح پیلت را با لوپ استریل از منطقه تلقیح در تمامی پلیت Streak کرده به طوری که کلنی‌های جدا از هم بدست آید (مطابق شکل زیر). پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم. در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه می‌دهیم.

تذکر:

a) برای هر بیمار استفاده از یک پلیت با قطر ۱۰-۸ سانتی‌متری برای هر محیط الزامیست و نباید از پلیت ۶ سانتی‌متری استفاده نمود، زیرا احتمال جداسازی کاهش می‌یابد.

b) برای تلقیح در محیط‌های انتخابی مانند XLD، HE، SF یا SS باید مقدار بیشتری نمونه تلقیح شود.

c) در مواردی که نمونه مدفوع قوام‌دار است توصیه می‌شود، کشت از سوسپانسیون مدفوع در سرم فیزیولوژی انجام گردد.



۲- تلقیح محیطم مایع غنی‌کننده GN یا SF براث:

نمونه را با سواب به داخل محیط GN یا SF براث برده، سواب را دور می‌اندازیم.

معمولاً برای محیط GN براث ۶-۴ ساعت انکوباسیون و محیط SF براث ۱۲-۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد توصیه می‌شود. همچنین در بعضی منابع جدید برای انکوباسیون GN براث ۸-۶ ساعت و SF براث ۲۴-۱۸ ساعت ذکر شده است.

بعد از این زمان از سطح محیط براث بدون مخلوط کردن (به دیل حرکت بیشتر سالمونلاها در مقایسه با E.coli و تراکم سالمونلا در سطح براث) یک لوپ برداشته، روی پلیت MAC و XLD کشت می‌دهیم، به طوری که کلنی‌های جدا از هم بدست آید. همه پلیت‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم. در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه می‌دهیم.

ج- جداسازی و تشخیص

بعد از انکوباسیون، میزان رشد، شکل و رنگ کلنی‌ها در هر یک از محیط‌های کشت داده شده بررسی و ثبت می‌شود.

شیگلا

کشت

کلنی‌های شیگلا بر روی محیط MAC بی‌رنگ یا همرنگ محیط با قطر ۳-۲ میلی‌متر، روی محیط HE سبز یا آبی- سبز (سبزتر از کلنی سالمونلا) بدون مرکز سیاه و روی محیط XLD قرمز یا صورتی بدون مرکز سیاه با قطر ۲-۱ میلی‌متر می باشند. کلنی شیگلا دیسانتری سروتایپ ۱ روی این محیط‌ها کوچک‌تر بوده و معمولاً روی محیط‌های با میزان مهارکنندگی کمتر مانند MAC بهتر رشد می‌کنند و بر روی محیط XLD برخلاف سایر گونه‌های شیگلا خیلی ریزترند.

۱- تشخیص بیوشیمیایی

کلنی‌های مشکوک به شیگلا را می‌توان روی محیط Kligler Iron Agar (KIA) یا Triple Sugar Iron Agar (TSI) از نظر بیوشیمیایی و تعیین سروگروه، غربالگری نمود.

لازم به ذکر است که جهت انجام تمامی تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی باید یک کلنی کاملا ایزوله مشکوک به شیگلا را از پلیت‌های MAC یا XLD یا... به دقت انتخاب کرده آنس را به وسط کلنی تماس دهید، از آن سوسپانسیونی در ^{cc}۱-۰/۵ سرم فیزیولوژی استریل تهیه و برای انجام همه تست‌های بیوشیمیایی استفاده کنید. اگر کلنی کاملاً ایزوله روی محیط وجود ندارد، می‌توانید از کلنی مشکوک برداشته روی پلیت دیگری Streak کرده تا کلنی‌های خالص بدست آید و سپس از آن برای تلقیح TSI یا KIA و سایر تست‌های بیوشیمیایی استفاده نمایید. در صورت عدم استفاده از کلنی خالص واکنش‌های کاذب روی محیط KIA یا TSI ایجاد می‌شود.

محیط‌های KIA یا TSI را با فرو کردن آنس به عمق محیط و سپس استریک روی سطح شیب‌دار تلقیح کنید. پس از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد واکنش را بررسی نمایید.

تذکر:

a) در طی انکوباسیون محیط KIA یا TSI باید در لوله یا پنبه آن برای تهویه شل باشد، در غیر اینصورت نتایج گمراه کننده‌ای بدست می‌آید.

b) حجم محیط KIA یا TSI در لوله باید به اندازه‌ای باشد که عمق و سطح شیب‌دار محیط هر یک حداقل ۳سانتی‌متر باشد. سویه‌های شیگلا بر روی این دو محیط منظره Alk/Acid [سطح قلیایی (قرمز) و عمق اسیدی (زرد)] بدون تولید گاز و H_2S ایجاد می‌کند. بعضی سویه‌های شیگلا فلکسنری ۶ و موارد استثنایی از شیگلا بوئیدی در این دو محیط گاز تولید می‌کنند. همچنین سویه‌های شیگلا سونئی لاکتوز را در انکوباسیون طولانی تخمیر می‌کنند.

قبل از آزمایشات تعیین سروگروه، از تست‌های بیوشیمیایی حرکت، اوره و لایزین دکربوکسیلاز که برای شیگلاها منفی هستند، استفاده کنید. باکتری‌هایی که با تست‌های فوق واکنش‌های مشکوک به شیگلا را ایجاد می‌کنند، باید با تست‌های بیوشیمیایی ذکر شده در فلوچارت ۱ تشخیص داده شود و سپس با آنتی سرم تعیین سروگروه شوند. این سویه‌ها باید برای تأیید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان ارسال شده و ۵٪ سویه‌ها از مرکز

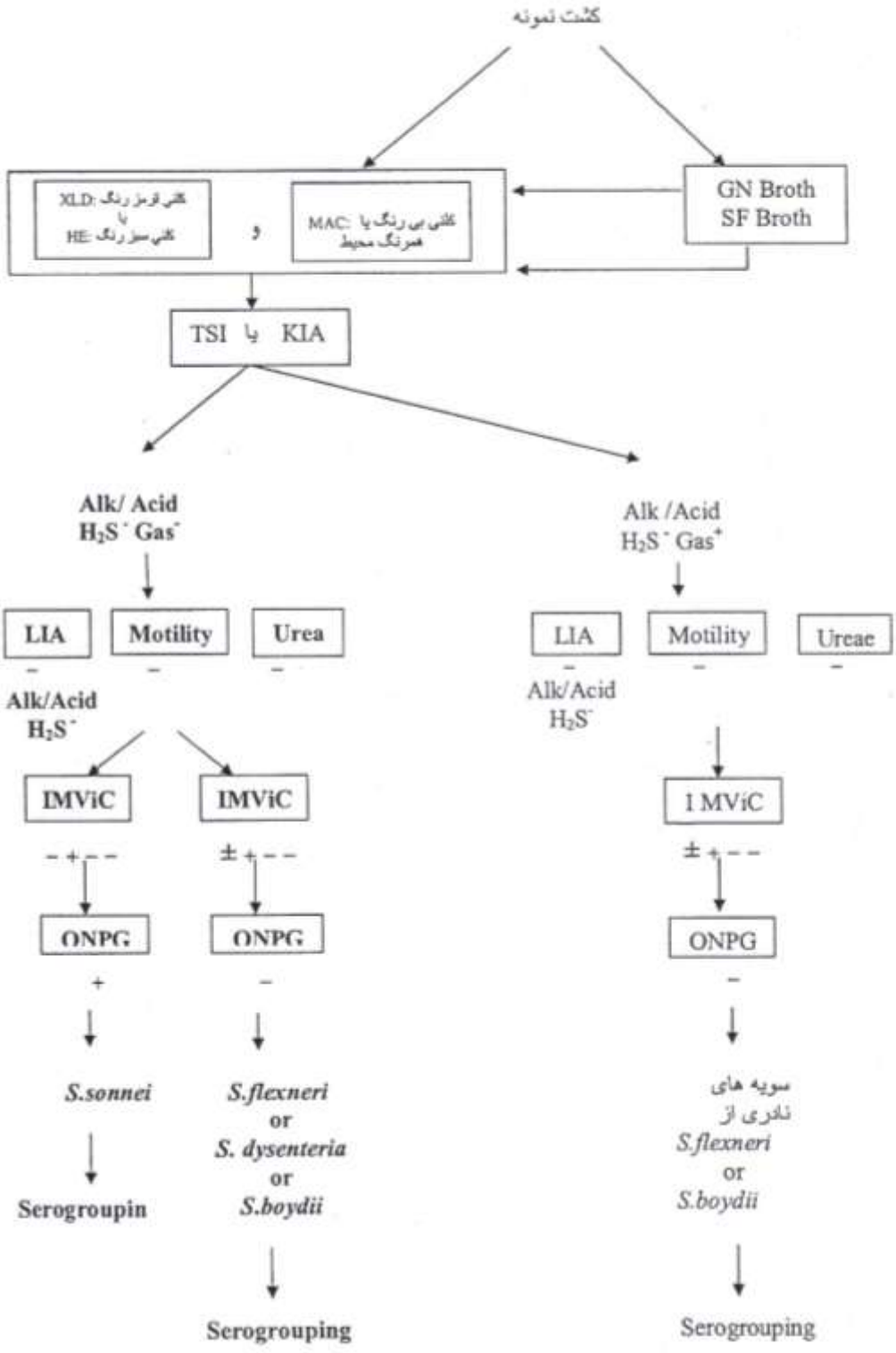
بهداشت استان به آزمایشگاه‌های همکار، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یـا انسـتیتو پاسـتور (مرجـع کشـوری E.coli) ارسال شوند.

c) برای تهیه محیط LIS حجم آن در لوله باید به مقداری باشد که محیط دارای ۴ سانتی‌متـر عمـق و ۲ سانتی‌متر سطح باشد. همچنین تلقیح باید دو بار در عمق محیط و یک بار روی سـطح انجـام شـود تـا شـرایط بی‌هوازی لازم انجام گردد. در طی انکوباسیون محیط LIA نیز باید در لوله یا پنبه آن برای تهویه شل باشد، در غیر این صورت نتایج گمراه‌کننده‌ای بدست می‌آید.

d) گزارش واکنش اوره از روی محز اوره آگار می‌باشد. در تعیین واکنش اوره آز این محـیط از محـیط اوره راث حساس‌تر است. لازم به ذکر است اوره براث برای باکتری‌های با اوره آز بسیار قوی مانند پروتئـوس مناسـب است.

e) در مواردی که نیاز به تشخیص سریع باشد، توصیه می‌گردد تست‌های بیوشیمیایی فلوچارت ۱ به طـور همزمان انجام شود و با توجه به هزینه بالای آنتی سرم در صورت شک به باکتری در مرحله بعد سروگروه تعیین گردد.

فلوچارت ۱ : جداسازی، غربالگری و تشخیص بیوشیمیایی شیگلا



واکنش‌های بیوشیمیایی تشخیصی شیگلا:

BIOCHEMICAL TEST	S. DYSENTERIAE	S.FLEXNERI	S.BOYDII	S.SONNEI
Serogroup	A	B	C	D
ONPG	-	-	-	-
Omithine decarboxylase	-	-	-	-
Fermentation of:				
Lactose	-	-	-	-
Mannitol	-	+	+	+
Raffinose	-	D	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Xylose	-	-	D	-
Indote production	D	D	D	-
+ 90% or more strains positive. - 90% or more strains negative. D different strains positive/negetive				

تذکر:

a) تولید گاز در KIA یا TSI- شیگلاها بر روی این دو محیط به طور مشخص واکنش Alk/Acid بدون تولید گاز و H_2S ایجاد می‌کنند. اما بعضی از سویه‌های شیگلا فلکسنری سروتایپ ۶ و سویه‌های نادری از شیگلا بوئیدی سروتایپ‌های ۱۳ و ۱۴ در این دو محیط گاز تولید می‌کنند.

b) تخمیز لاکتوز- شیگلاها لاکتوز را تخمیر نمی‌کنند. اما شیگلا سونئی لاکتوز را در انکوباسیون طولانی (بیش از ۴۸ ساعت) تخمیر کرده و اسید تولید می‌کنند.

c) تخمیر مانتیول- سروتایپ‌های شیگلا دیسانتری، شیگلا فلکسنری سروتایپ ۶ واریته Newcastele و شیگلا فلکسنری سروتایپ ۲b مانیتول را تخمیر نمی‌کنند ولی سایر گونه‌های شیگلا مانتیول را تخمیر می‌کنند.

d) ONPG- شیگلا سونئی و ۱۵٪ از شیگلا دیسانتری‌ها (سروتایپ ۱) و ۸٪ از شیگلا بوئیدی‌ها (سروتایپ ۹)، ONPG مثبت‌اند. سایر گونه‌های شیگلا ONPG منفی می‌باشند.

e) تولید اندول- شیگلا سونئی، شیگلا دیسانتری سروتایپ ۱ و شیگلا فلکسنری سروتایپ ۶ اندول منفی‌اند. سایر گونه‌های شیگلا متفاوتند. (از نظر شیوع سویه‌های اندول منفی بیشر جدا می‌شوند).

f) واکنش Ornithine decarboxylase- شیگلا سونئی Ornithine decarboxylase مثبت است، اما سایر شیگلاها منفی هستند.

۲- تعیین سروگروه (Serogroupnig)

انجام آزمایش با آنتی سرم برای تشخیص شیگلاها ضروری است. جنس شیگلا دارای ۴ سروروه یا زیرگروه می‌باشد:

S.dysenteriae (Serogroup A) , S.flexneri (Serogroup B) , S. boydii(Serogroup C), S. sonnei (Serogroup D)

سروگروه یا زیرگروه A دارای ۱۵ سروتایپ، B دارای ۸ سروتایپ، C دارای ۱۹ سروتایپ و D فقط دارای یک سروتایپ می‌باشد.

تعیین سروگروه (Serogroupnig) به وسیله آگلوتیناسیون بر روی لام با آنتی سرم‌های سوماتیک O شامل polyA، polyB، polyC و polyD انجام می‌شود. از آنتی سرم‌های مونووالان برای تشخیص اختصاصی سروتایپ‌ها استفاده می‌شود و تعیین سروتایپ در آزمایشگاه‌های مرجع امکان‌پذیر است.

در مواردی که سویه مورد آزمایش با آنتی سرم poly group A آگلوتینه ایجاد نماید، این سویه شیگلا دیسانتری می‌باشد و برای تعیین سروتایپ باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آن‌جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شود. سروتایپ ۱ شیگلا دیسانتری (Sd1) همه‌گیری‌های گسترده، طولانی و شدید با مرگ‌ومیر فراوان ایجاد می‌کند و شناسایی آن از اهمیت خاصی برخوردار است.

قبل از انجام آزمایش با آنتی سرم، کارکنان انجام دهنده آزمایش باید بروشور داخل بسته آنتی سرم را کاملاً مطالعه نمایند. برای انجام آزمایش یک لام تمیز برداشته و روی یک سمت آن یک قطره سرم فیزیولوژی و سمت دیگر آن یک قطره آنتی سرم قرار دهید. از روی محیط KIA یا TSI (توجه: به هیچ وجه از محیط‌های انتخابی مانند MAC یا XLD برای انجام آزمایش آنتی سرم استفاده نکنید زیرا نتایج گمراه کننده‌ای بدست می‌آید). بوسیله لوپ، آنس یا اپلیکاتور چوبی به طور جداگانه استریل کمی کلنی برداشته، ابتدا در قطره سرم فیزیولوژی و سپس در قطره آنتی سرم سوسپانسیون یکنواختی تهیه کنید. لام را به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه (با توجه به بروشر آنتی سرم این زمان متفاوت است) به صورت دورانی حرکت دهید. تشکیل ذرات آگلوتیناسیون را زیر نور چراغ مطالعه به دقت بررسی کنید. مطمئن شوید که قطره سوسپانسیون سرم فیزیولوژی فاقد ذرات آگلوتیناسیون باشد.

الف- اگر در قطره سرم فیزیولوژی ذرات آگلوتیناسیون ایجاد شود، واکش آگلوتیناسیون خودبه‌خودی است که به علت کلنی خشن Rough ایجاد می‌شود. در این صورت تشکیل ذرات آگلوتیناسیون در قطره آنتی سرم فاقد ارزش است. باکتری برای تعیین هویت باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آن‌جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شود. گاهی استفاده از محیط‌های حاوی قند زیاد مانند TSI یا KIA می‌تواند باعث ایجاد آگلوتیناسیون خودبه‌خودی شود. در این موارد کلنی را بر روی محیط بدون قند مانند بلاد آگار کشت داده و آزمایش آنتی سرم مجدد انجام شود.

ب- اگر قطره سوسپانسیون سرم فیزیولوژی یکنواخت بوده و فاقد ذرات اتو آگلوتیناسیون باشد و در قطره آنتی سرم ذرات آگلوتیناسیون تشکیل شود، واکنش مثبت می‌باشد.

ج- در سویه‌های جدا شده که از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی شبیه شیگلا هستند، اما با آنتی سرم‌های پلی شیگلا آگلوتیته ضعیفی داده یا آگلوتیته نمی‌دهند، احتمال پوشیده شدن آنتی‌ژن سوماتیک (O) به وسیله آنتی‌ژن کپسولی وجود دارد. برای از بین بردن آنتی‌ژن کپسولی باشد:

۱- سوسپانسیون غلیظی از سویه جدا شده در سرم فیزیولوژی استریل تهیه نموده و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت دهید.

۲- بعد از خنک شدن سوسپانسیون یک قطره از آن را در یک قطره نرمال سالین برای تعیین واکنش اتو آگلوتیناسیون آزمایش کنید.

۳- اگر سوسپانسیون سرم فیزیولوژی آگلوتینه نبود، دوباره آن را با آنتی سرم پلی مجاور کنید.

تذکر:

۱- تمام سویه‌هایی که از نظر بیوشیمیایی به عنوان شیگلا تشخیص داده می‌شوند اما با آزمایش با آنتی سرم منفی هستند، باید برای تشخیص قطعی به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آن‌جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شوند.

۲- همه آنتی سرم‌ها باید قبل از استفاده جهت اطمینان از واکنش‌های مورد انتظار مورد آزمون کنترل کیفی قرار گیرند. برای کنترل کیفی هر آنتی سرم باید از سوش‌های کنترل مثبت و منفی استفاده کرد. نتایج تمام واکنش‌ها باید ثبت شود. منابع تهیه سویه‌های کنترل مثبت و منفی در راهنمای کنترل کیفی محیط‌های کشت آمده است.

۳- آزمایش تعیین حساسیت:

گاستروانتریت خفیف معمولاً بدون درمان آنتی بیوتیکی بهبود می‌یابد. به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده در بین سویه‌های شیگلا، برای تمام سویه‌های جدا شده باید آزمایش تعیین حساسیت میکروبی انجام شود. گزارش نتایج آزمایش تعیین حساسیت به پزشک برای شیگلا دیسانتری سروتایپ ۱ (Sd1) حائز اهمیت است. در بعضی نواحی آسیا و آفریقا سویه‌های Sd1 به آنتی بیوتیک‌های رایج مانند نالیدیکسیک اسید مقاوم شده است، اما هنوز به فلوروکینولون‌ها مانند سیپروفلوکساسین حساسند. به طور معمول آمپی سیلین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، یک فلوروکینولون مانند سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید آنتی بیوتیک‌های انتخابی برای آزمایش تعیین حساست و گزارش به پزشک می‌باشند.

تذکر:

هر چند نسل اول و دوم سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوزیدها (مانند جنتامایسن و آمیکاسین) ممکن است در محیط آزمایشگاه (invitro) برای گونه‌های شیگلا (وسالمونلا) حساس باشند، اما از نظر بالینی مؤثر نبوده و نباید استفاده و گزارش شوند.

جدول ۵- استاندارد (CLSI) تفسیر قطر هاله عدم رشد برای شیگلا و سالمونلا:

Antimicobial Agent	Disk content	Zone Diameter (mm)		
		R	I	S
Ampicillin	10µg	≤13	14-16	≥17
Ciprofloxacin	5µg	≤15	16-20	≥21
Nalidixic acid	30µg	≤13	14-18	≥19
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/ 23.75 µg	≤10	11-15	≥16

* برای کنترل کیفی آزمایش آنتی بیوگرام و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به راهنمای مربوطه مراجعه نمایید.

سالمونلا:

جنس سالمونلا باسیل‌های گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه بوده و در تقسیم‌بندی جدید دارای دو گونه می‌باشد: Salmonella enterica و Salmonlla bongori. سالمونلا انتریکا به ۶ زیرگونه تقسیم می‌شود زیرگونه I تا VI. سویه‌های زیرگونه I معمولاً از انسان و جانوران خونگرم جدا می‌شوند. این زیرگونه به عنوان S.enterica Subsp. Enterica نام برده می‌شود. اکثر سویه‌های بیماری‌زای انسانی در این زیر گونه قرار دارند. سایر زیرگونه‌ها و گونه بنگوری در انسان بسیار نادرند و از جانداران خونسرد و محیط جدا می‌گردند.

نامگذاری سالمونلا:

نامگذاری جدید سویه‌های سالمونلا که در حال حاضر توسط CDC مورد استفاده می‌شود، به صورت زیر می‌باشد:

۱- ابتدا نام جنس باید به صورت ایتالیک نوشته شود: Salmonella

۲- نام گونه به صورت ایتالیک نوشته شود: مثلاً enterica

۳- نام سروتایپ به صورت غیرایتالیک و حرف اول آن با حرف بزرگ نوشته شود. مثلاً Typhi

با توجه به آنچه گفته شد معرفی سویه‌های زیرگونه I این چنین می‌باشد:

Salmonella enterica subspecies *enterica* serotype Paratyphi B

هر چند در این روش اصول و ضوابط کلی در نامگذاری رعایت شده است. اما پزشکان و میکروب‌شناسان بالینی، نامگذاری ساده‌ای را برای گزراش روزمره استفاده می‌کنند که در آن نام اختصاصی سروتایپ مقدم باشد:

Salmonella Paratyphi B یا *Salmonella* serotype Paratyphi B

باید توجه داشت که در این‌جا نحوه نگارش Paratyphi B نشانه نام سروتایپ است، نه نام گونه (به مانند سایر باکتری‌ها). همچنین سالمونلا از نظر تست‌های بیوشیمیایی و نحوه گزارش اولیه به ۳ گروه تقسیم می‌شوند (جدول ۱):

1) Nontyphoidal *Salmonella* 2) *Salmonella* Typhi 3) *Salmonella* Paratyphi A

کشت:

کلنی سویه‌های سالمونلا بر روی محیط MAC بی‌رنگ یا همرنگ محیط، HE آبی یا سبز- آبی با مرکز سیاه و XLD قرمز با مرکز سیاه می‌باشند. (در مواردی ممکن است تولید H_2S تا ۴۸ ساعت بعد صورت بگیرد.)

۱- تشخیص بیوشیمیایی:

کلنی‌های مشکوک به سالمونلا را می‌توان روی KIA یا TSI غربالگری نمود. لازم به ذکر است که جهت انجام تمامی تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی باید یک کلنی کاملاً ایزوله مشکوک به سالمونلا را از پلیت‌های MAC یا XLD یا... به دقت انتخاب کرده آنس را به وسط کلنی تماس دهید، از آن سوسپانسیونی در ^{cc}۱- ۰/۵ سرم فیزیولوژی استریل تهیه و برای انجام همه تست‌های بیوشیمیایی استفاده کنید. اگر کلنی کاملاً ایزوله روی محیط وجود ندارد می‌توانید از کلنی مشکوک برداشته روی پلیت دیگری streak نمایید تا کلنی‌های

خالص به دست آید و سپس از آن برای تلقیح KIA یا TSI و سایر تست‌های بیوشیمیایی استفاده کنید. محیط‌های KIA یا TSI را مطابق آنچه در مبحث شیگلا توضیح داده شد تلقیح و انکوبه نمایید.

اکثر سویه‌های سالمونلا بر روی این دو محیط واکنش H_2S^+، Gas^+ و Alk/Acid ایجاد می‌کنند. روی این دو محیط *Salmonella* Typhi واکنش Alk/Acid بدون تولید گاز و با مقدار کم H_2S در خط تلقیح آنس ایجاد می‌نمایند.

محیط Lysine Iroin Agar (LIA) نیز محیط غربالگری مناسبی است، زیرا سویه‌های سالمونلا به استثنای *Salmonella* Paratyphi A، لایزین را دکربوکسیله کرده و اغلب H_2S تولید می‌کنند. بدین گونه که روی محیط LIA منظره Alk/Alk (سطح بنفش، عمق بنفش) با تولید H_2S در عمق مشاهده می‌شود.

سویه‌هایی که با تست غربالگری فوق واکنش‌های مشخص سالمونلا را ایجاد می‌کنند، باید با مجموعه‌ای از تست‌های بیوشیمیایی تشخیص داده شوند (جداول ۲، ۱ و فلوچارت ۲) و با آنتی سرم‌های پلی O، گروه D، C، B و A مورد آزمون آنتی سرمی قرار گیرند. این سویه‌ها باید برای تأیید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و ۵٪ آن به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شوند.

جدول ۶- تست‌های بیوشیمیایی کاربردی در افتراق سالمونلا از سایر انتروباکتریاسه‌ها و

تشخیص سالمونلا تایفی و سالمونلا پاراتایفی A

Test	Nontyphoidal *Salmonella* subsp. I reaction	*Salmonella* serotype Typhi reaction	*Salmonella* Paratyphi A reaction
TSI	K/A_{gas}	K/A	K/A_{gas}
Glucose	+/gas	+	+/gas
Lactose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
H_2S(TSI)	+	$+^{weak}$	- or $+^{weak}$
Indole	-	-	-
MR	+	+	+
VP	-	-	-
Citrate(simmons)	+	-	-
Urea(Agar)	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	-
Ornithine decarboxylase	+	-	+
Motility	+	+	+
ONPG	-	-	-

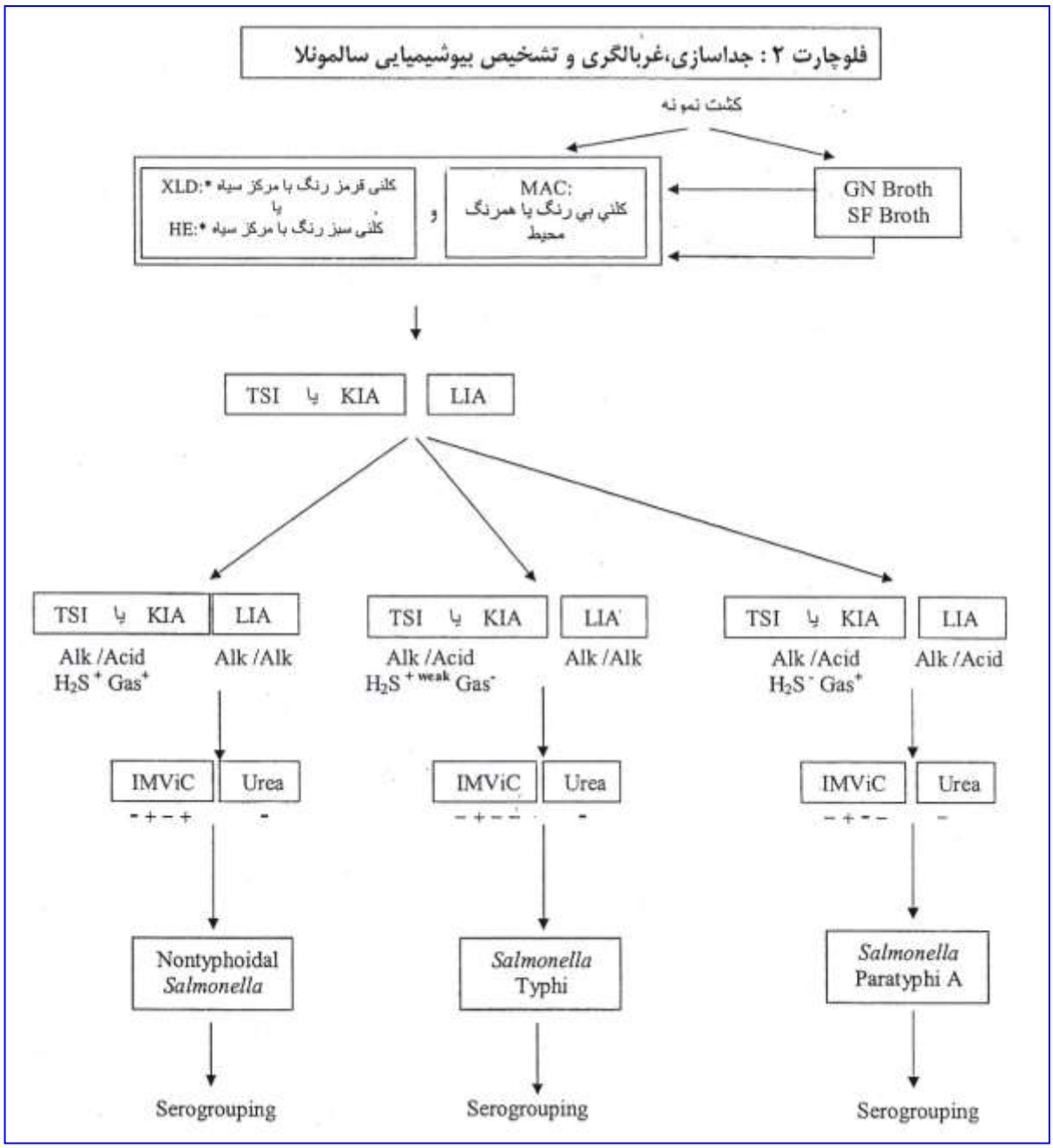
توضیحات:

۱- واکنش مثبت در ۹۰٪ موارد بعد از ۲-۱ روز ایجاد می‌شود.

۲- H_2S از روی محیط TSI گزارش می‌شود (نه SIM).

۳- تولید گاز را بر روی TSI یا KIA می‌توان بررسی نمود.

۴- سالمونلاها اندول منفی و اوره منفی (اوره آگار) هستند و در صورت مثبت شدن جنس سالمونلا رد می‌شود.



توضیحات:

* رنگ سیاه در مرکز کلنی‌های سالمونلا بر روی محیط‌های XLD و HE ممکن است بعد از ۲۴ ساعت اول انکوباسیون ایجاد شود.

اگر سویه مورد آزمون از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی به طور مشخص شبیه سالمونلا است، اما با آنتی‌سرم‌های سالمونلا آگلوتینه نمی‌دهد، سویه باکتریایی مورد آزمون باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آن‌جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شود.

از آن‌جایی که تولید H_2S یکی از واکنش‌های مهم در تشخیص سالمونلا می‌باشد، افتراق آن از سایر انتروباکتریاسه‌های H_2S مثبت حائز اهمیت است:

جدول۷- تست‌های بیوشیمیایی مهم جهت افتراق سالمونلا از سایر انتروباکتریاسه‌های H_2S مثبت

Test	Edwardsiella tarda	Citrobacter freundii	Salmonella subsp. I	Proteus vulgaris	Proteus mirabilis
VP	-	-	-	-	±
MR	+	+	+	+	+
Indole	+	-(70%)	-	+	-
Citrate	-	+(78%)	+	±	±
PAD*	-	-	-	+	+
Urea(Agar)	-	-(56%)	-	+	+
Lysine	+	-	+	-	-
Ornithine	+	-	+	-	+
ONPG	-	+	-	-	-

*PAD; Phenylalanine Deaminase

تذکر:

۱- به علت تشابه سیتروباکتر با سالمونلاها در آنتی‌ژن‌های H، O یا Vi تشخیص بیوشیمیایی سالمونلا قبل از استفاده از آنتی سرم بسیار حائز اهمیت است.

۲- در مواردی که نیاز به تشخیص سریع باشد، توصیه می‌گردد تست‌های بیوشیمیایی فلوچارت ۲ به طور همزمان انجام شده و با توجه به هزینه بالای آنتی سرم در صورت شک به باکتری در مرحله بعد تعیین سروگروه انجام شود.

موارد استثناء واکنش‌های بیوشیمیایی تشخیص سالمونلا:

a) تولید H_2S اکثر سالمونلاها در محیط KIA و TSI، H_2S تولید می‌کنند. اما سروتایپ پاراتایفی A و ۵۰٪ از سویه‌های کلراسوئیس H_2S منفی‌اند.

b) تولید گاز در KIA یا TSI- سالمونلاها در این دو محیط گاز تولید می‌کنند. اما سالمونلا تایفی و سالمونلا گالیناروم استثناهای مهمی هستند و هرگز گاز تولید نمی‌کند.

c) سیترات- اکثر سالمونلاها از سیترات به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند، اما برخی از سروتایپ‌ها مانند تایفی، پاراتایفی A، گالیناروم و پولوروم و اکثر سویه‌های سالمونلا کلرا سوئیس سیترات منفی‌اند.

d) لایزین دکربوکسیلاز- سالمونلاها لایزین دکربوکسیلاز مثبت‌اند، به استثناء سالمونلا پاراتایفی A که لایزین منفی است.

e) حرکت- سالمونلاها حرکت مثبت‌اند، به استثناء سالمونلا گالیناروم (Gallinarum) و پولوروم (Pullorum) که غیرمتحرک‌اند.

f) اورنیتین دکربوکسیلاز- سالمونلاها اورنیتین دکربوکسیلاز مثبت‌اند، به استثناء سالمونلا تایفی و گالیناروم.

۲- تعیین سروگروه (Serogrouping)

استفاده از آنتی سرم در تشخیص سالمونلاها ضروری است. تعیین سرگروه به وسیله آگلوتیناسیون بر روی لام با آنتی سرم‌های O (سوماتیک) انجام می‌شود. آنتی‌سرم‌های پلی O مورد استفاده در تعیین سرگروه سالمونلا شامل آنتی‌سرم‌های گروه A تا E می‌باشد، زیرا حدود ۹۵٪ از سویه‌های سالمونلا متعلق به این گروه‌هاست. برای مثال سالمونلا تایفی و انتریتیدیس در سروگروه D، کلراسوئیس و نیوپورت در سروگروه C و تایفی موریوم در سروگروه B قرار دارند. از آن‌جایی که در آزمایشگاه‌های بهداشتی فقط آنتی سرم‌های پلی O، گروه D، C، B و A موجود است، پس از تعیین اولیه سروگروه، سویه سالمونلا برای مراحل سروتایپینگ که نیاز به آنتی سرم‌های H (فلاژله) و Vi (کپسولی) می‌باشد، به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال می‌گردد.

مراحل انجام آزمایش‌های سروگروه باید مطابق آنچه در مبحث شیگلا آمده است، انجام شود و در مواجهه با موارد ذیل سویه باکتریایی مورد آزمون باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آن‌جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شود:

- اگر سویه مورد آزمون از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی به طور مشخص شبیه سالمونلا هستند، اما با آنتی‌سرم‌های سالمونلا آگلوتینه نمی‌دهند.

• اگر سویه مورد آزمون از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی همه مشخصه‌ها سالمونلا را ندارد، اما با آنتی سرم‌های O سالمونلا آگلوتینه ایجاد می‌کند.

۳- آزمایش تعیین حساسیت

درمان ضد میکروبی برای موارد گاستروانتریت خفیف سالمونلایی پیشنهاد نمی‌شود، چون باعث طولانی شدن دوره ناقل بودن می‌گردد. همچنین آزمایش تعیین حساسیت میکروبی برای سویه‌های جدا شده از مدفوع جهت درمان توصیه نمی‌گردد. اما تعیین الگوی مقاومت ضد میکروبی با اهداف پایش گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های سالمونلا حائز اهمیت است.

در بیماران با عفونت مهاجم و تیفوئید درمان با آنتی بیوتیک‌های مناسب بسیار مهم و حیاتی است و پس از آزمایش تعیین حساسیت نتیجه باید گزارش شود.

به طور معمول آمپی سیلین، یک فلوروکینولون مانند سیپروفلوکساسین، تری متو پریم سولفامتوکسازول و نالیدیکسیک اسید آنتی بیوتیک‌های انتخابی جهت آزمایش تعیین حساسیت برای گونه‌های سالمونلا جدا شده از مدفوع و گزارش به پزشک می‌باشد. لازم به ذکر است در مواردی که نالیدیکسیک اسید مقاوم و سپیروفلوکساسین حساس باشد، احتمال ایجاد مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین در حین درمان وجود دارد. این مورد باید به پزشک اطلاع داده شود، خصوصاً در عفونت‌های مهاجم و باکتری‌های جدا شده از کشت خون.

در مواردی که عفونت از کشت خون جدا می‌شود، نسل سوم سفالوسپورین‌ها و کلرامفنیکل نیز تعیین حساسیت می‌شود.

تذکر: هر چند نسل اول و دوم سفالوسپورین‌ها و آمینو گلیکوزیدها (مانند جنتامایسین و آمیکاسین) ممکن است در محیط آزمایشگاه (in vitro) برای گونه‌های سالمونلا (و شیگلا) حساس گزارش شوند، اما از نظر بالینی، مؤثر نبوده و نباید استفاده و گزارش شوند.

(برای تفسیر قطر هاله عدم رشد در آزمایش تعیین حساسیت سالمونلا، به جدول مربوطه در مبحث شیگلا رجوع شود.)

* برای کنترل کیفی آزمایش آنتی بیوگرام و دیسک‌های آنتی بیوتیک به راهنمای مربوطه مراجعه نمایید.

سالمونلاهای مقاوم به آنتی بیوتیک:

در بررسی‌های به عمل آمده توسط CDC در سال ۲۰۰۰ میلادی ۵۰٪ از گونه‌های سالمونلا تایفی موریوم (سروگروپ B) جدا شده از نمونه‌های بالینی به یک یا بیش از یک آنتی بیوتیک و ۲۸ درصد آن‌ها به پنج آنتی بیوتیک مقاوم بوده‌اند. در سال ۲۰۰۱، ۲۶٪ از سالمونلا نیوپورت‌های جدا شده (سروگروپ C)، حداقل به ۹ آنتی بیوتیک مقاوم بوده‌اند. در ایران اطلاعات کافی در مورد مقاومت‌های چندگانه در سالمونلا وجود ندارد. در مواجهه با چنین مواردی، سویه موردنظر را جهت بررسی تکمیلی و انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال نمایید.

هـ) گزارش نتایج:

a) در موارد کشت مثبت:

- گزارش باکتری جدا شده پس از شناسایی، به صورت نیمه کمی براساس تعداد کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت‌های اولیه می‌باشد (Light, Moderate, Heavy)

مانند: "Heavy growth of *Salmonella* Typhi isolated"

b) در موارد کشت منفی:

- به این طریق گزارش نمایید:

"No Solmonella and Shigella isolated"

یرسینیا

مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی جنس یرسینیا عبارتند از: یرسینیا پستیس، یرسینیا سودوتوبرکلوزیس، یرسینیا اینتروکلوتیکا.

یرسینیاپیتیس یک پاتوژن بسیار ویرولان بوده و عامل بیماری سیستمیک بسیار کشنده به نام طاعون می‌باشد. دو گونه دیگر پاتوژن روده‌ای می‌باشد.

تمامی عفونت‌های یرسینیا بین انسان و حیوان مشترک بوده و انسان میزبان تصادفی می‌باشد. دو حالت از عفونت ناشی از یرسینیا پستیس وجود دارد:

۱- طاعون شهری که منبع اصلی آن موش‌ها هستند.

۲- طاعون جنگلی که سنجاب‌ها و خرگوش‌ها، موش‌های مزرعه، گربه‌های خانگی مخزن اصلی عفونت هستند. طاعون شهری در جمعیت موش‌ها باقی مانده و توسط گزش کک‌ها به انسان منتقل می‌شود.

تشخیص آزمایشگاهی

تهیه گسترش از چرک و ترشحات غدد لنفاوی، خلط، احشاء مختلف و رنگ‌آمیزی گرم که به آسانی باسیل گرم منفی کوتاه که انتهاهای آن بهتر رنگ می‌گیرد.

کشت در محیط بلاد آگار صورت گرفته و همچنین تلقیح به حیوان حساس مانند صفاق موش سفید صورت می‌گیرد.

کلبسیلا

اعضای جنس کلبسیلا دارای کپسول بوده و کلنی موکوئیدی ایجاد کرده، شایع‌ترین اعضای ایزوله شده این جنس، کلبسیلا پنومونیه است که ایجاد پنومونی می‌کند.

این باکتری سیترات و گلوکوز را به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار می‌دهد.

تشخیص آزمایشگاهی

در تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی گرم کپسول باکتری مشاهده می‌شود. تست تورم کپسولی در تشخیص کمک‌کننده است.

کشت در محیط بلاد آگار و مکانکی صورت می‌گیرد.

پروتئوس

عفونت مجرای اداری ناشی از پروتئوس میرابیلیس شایع‌ترین بیماری بوده، این ارگانیسم مقادیر زیادی اوره آز تولید می‌کند. باکتری به صورت باسیل‌های گرم منفی با پلی مورفیسم شدید، متحرک، فاقد تخمیر لاکتوز می‌باشد.

حالت سورامینگ (Swarming) یا خزیدن در محیط کشت از مشخصات مهم تشخیص باکتری است.

باکتری باعث عفونت دستگاه اداری و گوارشی در انسان شده و در انسان و حیوانات ایجاد بیماری می‌کند.

تشخیص آزمایشگاهی

تجزیه اوره، فنیل آلانین دآمیناز مثبت، تولید H_2S از خصوصیات این باکتری است.

ویبریو

این جنس دارای بیش از ۱۰۰ گونه از باسیل‌های خمیده بوده که تعدادی از آن‌ها در انسان بیماری‌زاست. ویبریوها با باسیل‌های گرم منفی خمیده و بی‌هوازی اختیاری و تخمیرکننده هستند.

مهم‌ترین اعضای این خانواده عبارتند از: ویبریوکلره، ویبریو پارا همولیتیکوس، ویبریو ولنیفیکوس.

گونه‌های ویبریو در انواع محیط‌های ساده و در دمای ۱۴ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند.

اکثر گونه‌های بیماری‌زا در انسان برای رشد نیاز به نمک داشته به جز ویبریوکلره که در غیاب نمک رشد می‌کند.

ویبریو کلره O1 و O139 با تولید کلرا توکسین در اپیدمی‌های وبا دخالت دارد و سایر گونه‌های ویبریو کلرا توکسین تولید نکرده و در اپیدمی‌های وبا نقش ندارند.

سرو گروه O1 ویبریو کلرا به سروتیپ‌های اینابا، اوگاوا، هیکوجیما تقسیم می‌شوند.

افرادی که در معرض ویبریو کلره O1 توکسین‌زا قرار می‌گیرند دچار عفونت‌های فاقد علائم یا اسهال خود محدود شونده می‌شوند ولی بیماری تا ایجاد اسهال شدید و کشنده نیز پیشرفت می‌کند. اسهال آبکی به همراه موکوس (مدفوع آب برنجی) به همراه دفع زیاد مایعات و الکترولیت، اسیدوز متابولیک و کاهش پتاسیم و شوک ناشی از کاهش حجم خون رخ می‌دهد.

تشخیص آزمایشگاهی

تهیه لام مرطوب از نمونه مدفوع و مشاهده حرکت باکتری در تشخیص مهم بوده ولی به دلیل ایجاد آلودگی شدید، این امر صورت نمی‌گیرد.

کشت در محیط TCBS و تولید کلنی زرد رنگ به علت تخمیر ساکاروز از موارد مهم در تشخیص باکتری است. کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفته، باکتری به دلیل حساس بودن بـه شـرایط اسـیدی از محیط‌های کشت قلیایی برای کشت استفاده می‌شود.

از محیط کاری بلر به عنوان محیط ترانسپورت برای انتقال نمونه به آزمایشگاه استفاده می‌شود.

کمپیلوباکتر

این جنس دارای باسیل‌های کوچک به شکل کاما یا بال پرنده دریایی، گرم منفی که به دلیـل فـلاژل‌هـای قطبی متحرک هستند. میکروآئروفیل بوده و به اتمسفری با اکسیژن کم و هیدروژن و دی‌اکسید کربن زیاد نیـاز دارند. باکتری موجب گاسترو آنتریت وسپتی سمی شده که کامپیلو باکتر ژژونی مهم‌ترین عامل گاسترو آنتریـت می‌باشد. عامل عفونت مشترک بین انسان و حیوان بوده و تهیه نادرست گوشت طیور مهـم‌تـرین منبـع عفونـت می‌باشد.

تشخیص آزمایشگاهی

باسیل‌های باریک و کوچک بوده که به راحتی در نمونه‌های رنگ شده با گرم از مدفوع نمی‌توان بـاکتری را مشاهده نمود که بررسی لام نیاز به مهارت در این امر دارد.

کشت در محیط‌های انتخابی که حاوی خون و شارکول صورت می‌گیرد. در محیط کشت اختصاصی اسکای رو باکتری در طی ۵-۳ روز رشد می‌کند. این محیط حاوی آنتی بیوتیـک ونکومایسـین، پلـی میکسـین و تـری متوپریم است. همچنین از محیط BHI نیز جهت کشت می‌توان استفاده نمود.

هکیلوباکتر

باسیل‌های گرم منفی مارپیچی مشابه کمپیلو باکتر و متحرک، عامل گاستریت، زخم‌های پپتیـک، سـرطان معده و لنفوم سلول‌های نوع B مرتبط با مخاط معده می‌باشد. باکتری از معده میمون، سگ، گربه، راسو، موش و رت‌ها جدا شده است. حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد جمعیت در کشورهای در حال توسعه آلوده به باکتری هلیکوبـاکتر می‌باشند.

باکتری اکسیداز و کاتالاز مثبت بوده و اوره آز قوی تولید می‌کند.

باکتری با تولید پروتئاز با تغییر مخاط معده و کاهش توانایی تولید اسید به مخاط معده نفوذ می‌کند و با فعالیت اوره آز قوی سبب تولید آمونیاک و بافری شدن اسید معده می‌شود.

تشخیص آزمایشگاهی

در رنگ‌آمیزی‌های رایج نمی‌توان باکتری را تشخیص داد ولی با رنگ‌آمیزی‌های گمیسا یا نقره می‌توان ارگانیسم خمیده یا مارپیچی را مشاهده نمود.

محیط کشت اسکای‌رو (حاوی ونکومایسین، پلی میکسین B، تری متوپریم، شکلات آگار)

در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط میکرو آئروفیلیک در مدت ۶-۳ روز کلنی‌های شفاف به قطر ۲-۱ میلی‌متر ایجاد می‌کند.

با اندازه‌گیری آنتی بادی‌های سرمی اختصاصی هکیلوباکتر در تشخیص عفونت فعال یا بعد از درمان می‌توان استفاده نمود.

برای بررسی فعالیت اوره آزی باکتری می‌توان با انتقال تکه‌ای از نمونه بیوپسی معده به محیط اوره حاوی معرف رنگی اضافه نموده و با تغییر رنگ محیط (در اثر در pH) به وجود باکتری پی برد.

در تست تنفسی که اوره نشان‌دار دارای C^{13} یا C^{14} به صورت خوراکی به بیماری خورانده شده در اثر فعالیت اوره آزی CO_2 نشان‌دار در بازدم بیمار دیده خواهد شد.

شناسایی آنتی‌ژن هکیلوباکتر پیلوری در نمونه‌های مدفوع تست مناسبی برای ارزیابی بهبودی بیماران مبتلا به عفونت می‌باشد.

کلا روش‌های تشخیص به ۲ گروه تقسیم‌بندی می‌شوند:

۱- روش‌های تهاجمی مانند بیپوسی معده با روش آندوسکوپیک و انجام تست اوره آز سریع.

۲- روش‌های غیرتهاجمی مانند آزمون‌های سرولوژیک، تست تنفسی اوره آز، تعیین آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتر پیلوری با روش PCR.

بروسلا

بروسلوزیس یا بیماری تب مالت، تب مواج، یک بیماری با انتشار جهانی و بیماری مشترک بین انسان و حیوان می‌باشد.

باکتری، انگل‌های اجباری داخل سلولی انسان و حیوانات بوده که از نظر متابولیکی نسبتاً غیرفعال هستند. دارای چندین گونه بوده که ۴ گونه آن از نظر ایجاد بیماری مهم‌تر می‌باشند که عبارتند از:

۱- بروسلا ملی تنسیس (بزها)

۲- بروسلا سوئیس (خوک‌ها)

۳- بروسلا آبرتوس (گاوها)

۴- بروسلا کانیس (سگ‌ها)

سایر گونه‌ها فقط در حیوانات یافت می‌شوند. مطالعات DNA نشان داده تمامی گونه‌ها در جنس بروسلاملی تنسیس با بیووارهای متعدد هستند.

انسان در اثر مصرف محصولات لبنی غیرپاستوریزه، گوشت خام یا نیم‌پز به بیماری مبتلا می‌شود.

بروسلا آبرتوس بیماری خفیفی ایجاد نموده در حالی‌که بروسلاملی تنسیس بیماری حاد و شدیدی ایجاد می‌کند.

بروسلاها پاتوژن حیوانی بوده و از طریق تماس تصادفی با مدفوع، ادرار، شیر و بافت‌های آلوده حیوانات به انسان نیز منتقل شده و کشاورزان، دامداران و دامپزشکان در تماس با حیوانات آلوده مبتلا به بیماری می‌شوند.

جدول ۸-

گونه‌ها	مخزن طبیعی	نیاز به CO_2	رنگ خوشین	رنگ تیونین
ملی تنسیس	بز- گوسفند	-	+	+
آبرتوس	گاو	+	±	-
سوئیس	خوک	-	±	+
کانیس	سگ	-	-	+

تشخیص آزمایشگاهی

کشت باکتری در محیط‌های بسیار غنی مانند محیط بروسلا، محیط تریپتی کیس سوی با ۵ درصد خون گوسفند، محیط BHI (محیط عصاره مغز و قلب) و محیط شکلات آگار رشد می‌کند. کشت‌ها در مجاورت ۱۰-۸ درصد CO_2 و در ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شده و برای موارد منفی به مدت ۳ هفته نگهداری می‌شوند. باکتری کاتالاز و اکسیداز مثبت بوده، برای بررسی فعالیت اوره آز باکتری کشت در سطح شیب‌دار محیط کریستنس اوره تلقیح شده که تست اوره آز مثبت نشان‌دهنده گونه‌های بروسلا می‌باشد. کشت خون روش مناسبی جهت تشخیص بیماری می‌باشد.

برای بررسی سطح آنتی بادی می‌توان از تست آگلوتیناسیون استفاده نمود.

رایج‌ترین روش آزمایشگاهی تشخیص بروسلوزیس استفاده از روش راپیدرز بنگال، رایت لوله‌ای، کمبس رایت و 2ME استفاده نمود.

از روش الایزا نیز جهت تشخیص و پیگیری درمان نیز استفاده می‌شود.

سودومونا

سودومونا آئروژنیوزا باکتری گرم منفی، هوازی اجباری، لاکتوز منفی ولی اکسیداز مثبت است. این باکتری عمدتاً در افرادی با ضعف ایمنی عفونت‌هایی از قبیل پنومونی، عفونت دستگاه اداری سپسیس ایجاد می‌کند. باکتری موجب عفونت‌های بیمارستانی مقاوم شده که در بسیاری از مواد ضدعفونی کننده و مواد شوینده و صابون‌ها قادر به رشد می‌باشد.

باکتری با تولید رنگدانه پیوسیانین و پیووردین در عفونت‌های پوستی در سوختگی‌ها دیده می‌شود.

تشخیص آزمایشگاهی

کشت در محیط مک کانگی یا EMB صورت گرفته و کلنی‌های بی‌رنگ (عدم تخمیر لاکتوز) ایجاد می‌شود. در محیط آگار حاوی مواد مغذی رنگدانه‌های آبی- سبز دیده می‌شود و رایحه میوه از آن استشمام می‌شود.