وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه مرجع سلامت

اداره مدیریت آزمایشگاههای بهداشتی

دستورالعمل

نمونه گیری ، انتقال و کشت نمونه مدفوع

جهت

جداسازی و تشخیص آزمایشگاهی

باکتری های سالمونلا و شیگلا

خرداد ماه 1389

آزمایشگاه مرجع سلامت

ویراستاران :

دکتر بابک ولی زاده	**بخش میکروب شناسی آزمایشگاه بهار**
دکتر محمد رهبر	**رئیس آزمایشگاه میکروب شناسی و عضو هیئت علمی آزمایشگاه مرجع سلامت**
دکتر شهلا فارسی	**رئیس اداره مدیریت آزمایشگاههای بهداشتی آزمایشگاه مرجع سلامت**
دکتر فریناز راشد مرندی	**عضو هیئت علمی آزمایشگاه مرجع سلامت**
دکتر حسین معصومی اصل	**رئیس اداره بیماریهای منتقله از آب و غذا و عفونتهای بیمارستانی مرکز مدیریت بیماریها**
دکترمحمد مهدی سلطان دلال	**استاد بخش میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران**

تهیه کننده :

رقیه صبوریان	**کارشناس میکروب شناسی آزمایشگاه مرجع سلامت**

جمع آوری و انتقال نمونه های مدفوع

1 – جمع آوری نمونه

نمونه گیری مدفوع باید در مراحل اولیه بیماری های روده ای و قبل از شروع درمان آنتی بیوتیکی انجام شود.

الف) نمونه مدفوع:

نمونه مدفوع باید در ظرف پلاستیکی تمیز (نیاز به استریل بودن نیست) ، دهان گشاد با درپوش محکم و فاقد نشتی جمع آوری شود. این ظرف باید عاری از مواد نگهدارنده، شوینده، یونهای فلزی یا کاغذ توالت باشد. نمونه مدفوع نباید با ادرار مخلوط شود. حداقل یک گرم مدفوع با قوام طبیعی (به اندازه یک فندق) یا 5 میلی لیتر مدفوع اسهالی برای کشت نیاز است. نمونه مدفوع باید تازه گرفته شده باشد و در مدت 30 دقیقه(به خصوص برای جداسازی شیگلا که بسیار حساس است) و حداکثر 2 ساعت بعد از نمونه گیری کشت داده شود. نمونه هایی را که نمی توان به فاصله 2 ساعت از نمونه گیری کشت داد، باید به محیط انتقالی منتقل کرد و بلافاصله در یخچال گذاشت. در این صورت نیاز به تهیه سوآب مدفوع می باشد.

ب) سوآب مدفوع:

برای قرار دادن نمونه مدفوع در محیط انتقالی، سوآبی را درون نمونه مدفوع قرار داده و پس از حرکت چرخشی، مقدار کمی از آن را بردارید. در صورت مشاهده موکوس در مدفوع باید با سوآب از آنها نیز نمونه گرفت. سوآب را تا عمق لوله محیط انتقالی وارد کنید و قسمت بالایی چوب را که با انگشتانتان لمس می کنید، بشکنید و دور بیندازید. در پیچ لوله را کاملاً ببندید. لوله را بلافاصله در یخچال قرار دهید. در صورت عدم دسترسی به یخچال آن را در مکانی خنک و دور از نور قرار دهید.

توجه:

برای جداسازی بهتر، از نمونه سواب مدفوع داخل محیط انتقالی،که در یخچال نگهداری شده است، ترجیحا" تا 24 ساعت پس از نمونه گیری کشت داده شود. محیط انتقال حاوی سوآب مدفوع یا رکتال را می توان حداکثر تا 3 روز در دمای یخچال نگهداری نمود.

ج) سوآب رکتال:

در موارد استفاده از سوآب رکتال به جای نمونه مدفوع از سوآب پنبه ای سالم استفاده کنید و دقت نمایید که پنبه سر آن کنده نشده باشد. ابتدا سوآب را با فرو کردن در محیط انتقال استریل مرطوب کرده، سپس به اندازه 3-2 سانتی متر داخل اسفنکتر رکتوم فرو برید، به آرامی بچرخانید تا با مخاط انتهایی رکتوم تماس یابد، سپس سواب را خارج کنید. با توجه به تغییر رنگ پنبه سر سوآب مطمئن شوید سوآب به مدفوع آغشته است.

حداقل 2 سوآب باید از بیمار گرفت و هر دو سوآب را در یک لوله حاوی محیط انتقال قرار داد.

2- محیط انتقال Carry-Blair

محیط انتقال کری بلر(PH=8.4)، محیط انتقال مناسب برای بسیاری از عوامل بیماری زای روده ای از جمله شیگلا، سالمونلا، ویبریو کلرا، اشریشاکلی O 157: H7 ، یرسینیا انتروکولیتیکا و کمپیلوباکتر می باشد.

آماده سازی محیط کری بلر:

مطابق دستور سازنده تهیه کنید.(یادآوری: چندین فرمول برای کری بلر در بازار موجود است.) هنگام آماده کردن کری بلر، مقداری که داخل هر ظرف ریخته می شود باید به اندازه ای باشد، که حداقل 4 سانتی متر عمق در لوله ایجاد شود. برای مثال مقدار 6-5 سی سی را در لوله های 100×13 میلی متر در پیچ دار می توان توزیع کرد. در حالی که در پیچها شل هستند، با بخار 100 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه سترون کنید(در اتوکلاو قرارندهید)، درپیچ ها را پس از سترون کردن محکم کنید. کری بلر باید در ظروف کاملاً در بسته در مکانی خنک و دور از نور نگهداری گردد. کری بلر در صورت کاهش نیافتن حجم محیط و عدم تغییر رنگ و آلودگی تا 6 ماه قابل استفاده است.

برای انجام کنترل کیفی محیط انتقالی کری بلر به راهنمای کنترل کیفی محیط های کشت مراجعه شود.

3 – انتقال نمونه

شماره نمونه و در صورت امکان نام بیمار و تاریخ نمونه گیری باید به صورت خوانا بر روی برچسب لوله نمونه نوشته شود. اطلاعات بیمار باید بر روی داده برگ ثبت شده ، یک نسخه با نمونه ها ارسال و دیگری توسط فرستنده نگهداری شود.

نمونه هایی که در یخچال نگهداری شده اند را باید در جعبه های عایق همراه با یخ یا بسته های یخ به آزمایشگاه ارسال کرد. اگر از یخ مرطوب استفاده شود، لوله یا ظرف را باید در ظرف ضد آب همچون کیسه های پلاستیکی که بتوان در آنها را محکم بست قرار داد تا نمونه ها از آبی که از ذوب یخ تشکیل می شود، محافظت شود.

جهت کسب اطلاعات بیشتر در این زمینه به دستورالعمل **راهنمای ایمنی جهت انتقال نمونه های عفونی** مراجعه شود.

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه مدفوع

الف- بررسی ماکروسکوپی

نمونه های 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 رنگ آمیزی گرم می توان وجود گلبولهای سفید، همچنین غالب بودن یک مورفولوژی باکتریایی، وجود سلولهای مخمر یا عدم وجود باسیلهای گرم منفی روده ای را در مدفوع تعیین نمود.

انتخاب، تلقیح و انکوباسیون محیط های کشت مدفوع

الف) انتخاب محیط های کشت

1) محیطهای پلیتی افتراقی و انتخابی:

برای کشت روتین مدفوع، جهت جداسازی باکتریهای بیماریزای روده ای باید از محیط های افتراقی و انتخابی زیر استفاده شود:

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

(از محیط**Hektoen Enteric Agar (HE)** هم می توان به جای **XLD** استفاده نمود.)

تذکر:

a) محیط **SS (Salmonella Shigella Agar)** برای جداسازی سالمونلا به کار می رود، اما باعث مهار رشد برخی از گونه های شیگلا می شود. لذا نباید از این محیط در موارد مشکوک به جداسازی شیگلا به جای **MAC** ، **XLD** یا **HE** استفاده نمود.

b) محیط **XLD** چون میزان مهار کنندگی کمتری روی رشد کلی فرمها دارد، برای جداسازی شیگلا مناسب تر از محیط **HE** می باشد.

2) محیط های مایع غنی کننده:

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

رایجترین این محیط ها (**Gram Negative Broth**) **GN** براث و **(Selenite F Broth) SF** براث می باشند.

تذکر:

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

b) هنگام ساخت محیط **SF** براث، حرارت دادن بیش از اندازه باعث ایجاد ذراتی در محیط می شود که در این صورت نمی توان از آن استفاده کرد. همچنین عملکرد محیط **SF** براث در شرایط بی هوازی بهتر می باشد، بنابراین مقدار محیط در لوله باید به اندازه ای باشد که حداقل 5 سانتی متر عمق ایجاد شود.

ب) تلقیح محیط های کشت و انکوباسیون

نمونه های مدفوع پس از تحویل به آزمایشگاه باید فورا" بر روی محیط های ذکر شده کشت داده شوند.

1-تلقیح محیط های پلیتی:

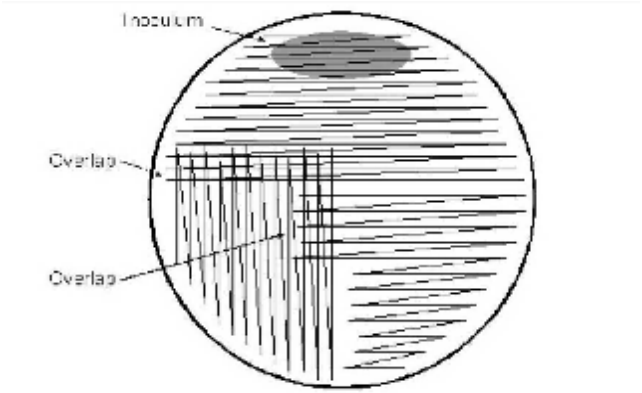
سوآب را روی سطح پلیت به قطر حدود 2/5 سانتیمتر می چرخانیم. سپس سطح پیلت را با لوپ استریل از منطقه تلقیح در تمامی پلیت **Streak** کرده به طوری که کلنی های جدا از هم بدست آید(مطابق شکل زیر). پلیت ها را به مدت 24 ساعت در 37-35 درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم. در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا 48 ساعت ادامه می دهیم.

تذکر:

a) برای هر بیمار استفاده از **یک پلیت با قطر** 10-8 **سانتیمتری** برای هر محیط الزامیست و نباید از پلیت 6 سانتیمتری استفاده نمود، زیرا احتمال جداسازی کاهش می یابد.

b) برای تلقیح در محیط های انتخابی مانند **XLD , HE , SF** و SS باید مقدار بیشتری نمونه تلقیح شود.

c) در مواردی که نمونه مدفوع قوام دار است توصیه می شود، کشت از سوسپانسیون مدفوع در سرم فیزیولوژی انجام گردد.



2-تلقیح محیط مایع غنی کننده **GN** یا **SF** براث:

نمونه را با سواب به داخل محیط **GN** یا **SF** براث برده، سواب را دور می اندازیم.

معمولا"برای محیط **GN** براث 6-4 ساعت انکوباسیون و محیط **SF** براث 12-8 ساعت انکوباسیون در 37-35 درجه سانتی گراد توصیه می شود. همچنین در بعضی منابع جدید برای انکوباسیون **GN** براث 8-6 ساعت و **SF** براث 24- 18 ساعت ذکر شده است.[5]

بعد از این زمان از سطح محیط براث بدون مخلوط کردن (به دلیل حرکت بیشتر سالمونلاها در مقایسه با **E.coli** و تراکم سالمونلا در سطح براث) یک لوپ برداشته، روی پلیت **MAC** و **XLD** کشت می دهیم، به طوری که کلنی های جدا از هم بدست آید. همه پلیت ها را به مدت 24 ساعت در 37-35 درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم. در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا 48 ساعت ادامه می دهیم.

ج- جداسازی و تشخیص

بعد از انکوباسیون، میزان رشد، شکل و رنگ کلنی ها در هر یک از محیط های کشت داده شده بررسی و ثبت می شود.

شیگلا

کشت:

کلنی های شیگلا بر روی محیط **MAC** بی رنگ یا همرنگ محیط با قطر 3-2 میلی متر ، 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 2-1 میلی متر می باشند. کلنی شیگلا دیسانتری سروتایپ 1 روی این محیط ها کوچکتر بوده و معمولاً روی محیط های با میزان مهار کنندگی کمتر مانند **MAC** بهتر رشد می کنند و روی محیط **XLD** بر خلاف سایر گونه های شیگلا خیلی ریزترند.

1- **تشخیص بیو شیمیایی**:

کلنی های مشکوک به شیگلا را می توان روی محیط **Kligler Iron Agar (KIA)** یا **Triple (TSI) Sugar Iron Agar** 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 1-5/. ^{cc} سرم فیزیولوژی استریل تهیه و برای انجام همه تستهای بیوشیمیایی استفاده کنید. اگر کلنی کاملاً ایزوله روی محیط وجود ندارد، می توانید از کلنی مشکوک برداشته روی پلیت دیگری **Streak** کرده تا کلنی های 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 می شود.

محیط های **KIA** یا **TSI** را با فرو کردن آنس به عمق محیط و سپس استریک روی سطح شیبدار تلقیح کنید. پس از 24-18 ساعت انکوباسیون در دمای 37-35 درجه سانتی گراد 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 کننده ای بدست می آید.

b) حجم محیط **KIA** و **TSI** در لوله باید به اندازه ای باشد که عمق و سطح شیبدار محیط هر یک حداقل 3 سانتی متر باشد. سویه های شیگلا بر روی این دو محیط منظره Alk/Acid [سطح قلیایی (قرمز)و عمق اسیدی (زرد)] بدون تولید گاز و H_2S ایجاد می کند. بعضی سویه های شیگلا فلکسنری 6 و مواردداستثنائی از شیگلا بوئیدی در این دو محیط گاز تولید می کنند. همچنین سویه های شیگلا سونئی لاکتوز را در انکوباسیون طولانی تخمیر می کنند.

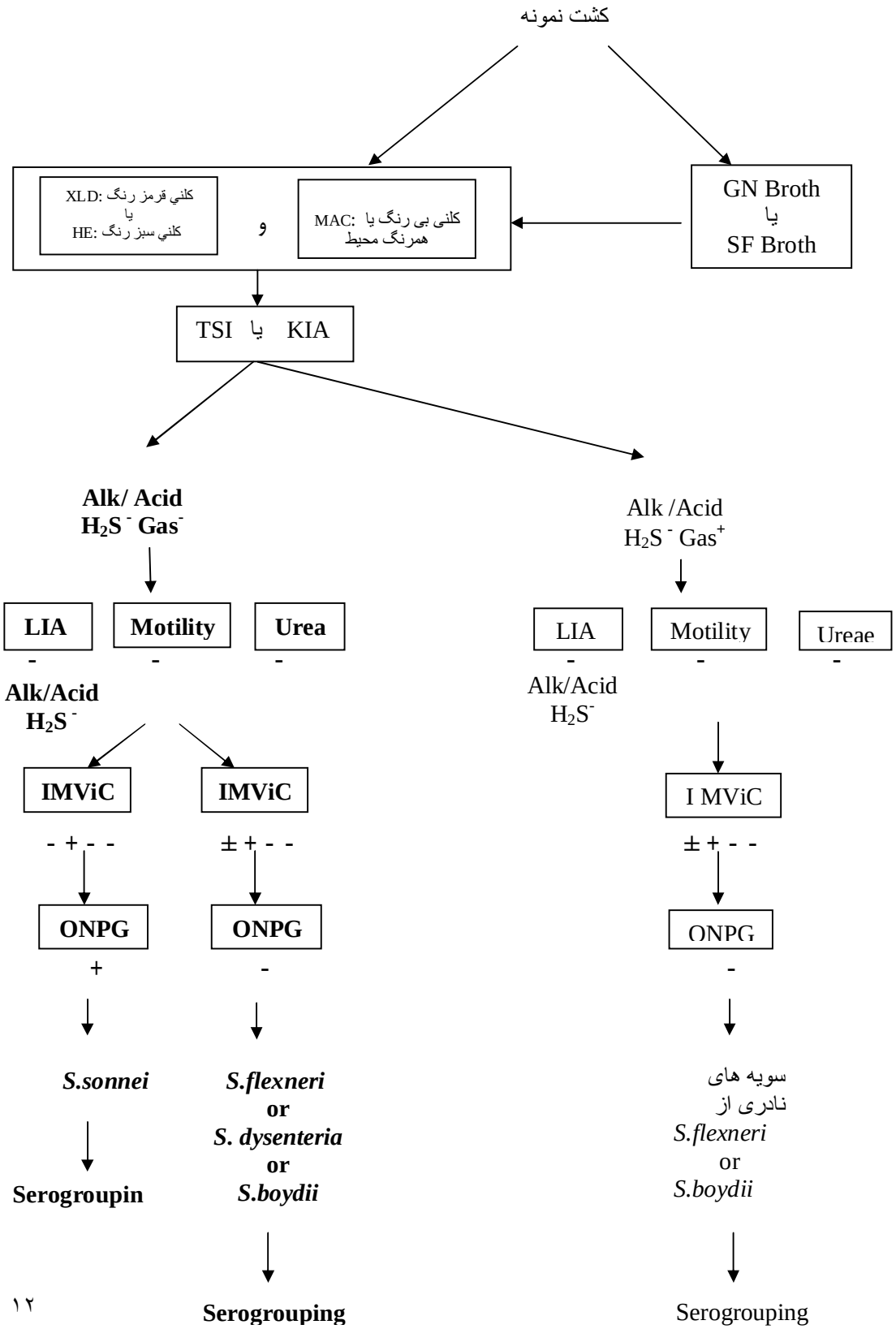
قبل از آزمایشات تعیین سروگروه، از تستهای بیوشیمیایی حرکت، اوره و لایزین دکربوکسیلاز که برای شیگلاها منفی هستند، استفاده کنید. باکتری هایی که با تستهای فوق واکنشهای مشکوک به شیگلا را ایجاد می کنند، باید با تستهای بیوشیمیایی ذکر شده در فلوچارت 1 تشخیص داده شود و سپس با آنتی سرم تعیین سروگروه شوند. این سویه ها باید برای تایید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان ارسال شده و 5٪ سویه ها از مرکز بهداشت استان به آزمایشگاههای همکار، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور(مرجع کشوری E.coli) ارسال شوند.

c) برای تهیه محیط **LIA** حجم آن در لوله باید به مقداری باشد که محیط دارای 4 سانتیمتر عمق و 2 سانتیمتر سطح باشد. همچنین تلقیح باید دو بار در عمق محیط و یک بار روی سطح انجام شود تا شرایط بی هوازی لازم انجام گردد. در طی انکوباسیون محیط **LIA** نیز باید در لوله یا پنبه آن برای تهویه شل باشد، در غیر اینصورت نتایج گمراه کننده ای بدست می آید.

d) گزارش واکنش اوره از روی محیط اوره آگار می باشد. در تعیین واکنش اوره آز این محیط از محیط اوره براث حساس تر است. لازم به ذکر است اوره براث برای باکتریهای با اوره آز بسیار قوی مانند پروتئوس مناسب است.

e) در مواردی که نیاز به تشخیص سریع باشد، توصیه می گردد تست های بیوشیمیایی فلوچارت 1 به طور همزمان انجام شود و با توجه به هزینه بالای آنتی سرم در صورت شک به باکتری در مرحله بعد سروگروه تعیین گردد.

فلوچارت 1 : جداسازی، غربالگری و تشخیص بیوشیمیایی شیگلا



واکنشهای بیو شیمیایی تشخیصی شیگلا [3]:

BIOCHEMICAL TEST	*S. DYSENTERIAE*	*S. FLEXNERI*	*S. BOYDII*	*S. SONNEI*
Serogroup	A	B	C	D
ONPG	−	−	−	+
Ornithine decarboxylase	−	−	−	+
Fermentation of:				
Lactose	−	−	−	−
Mannitol	−	+	+	+
Raffinose	−	D	−	−
Sucrose	−	−	−	−
Xylose	−	−	D	−
Indole production	D	D	D	−

+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; D, different strains positive/negative.

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 می کنند. اما بعضی از سویه های شیگلا فلکسنری سروتایپ 6 و سویه های نادری از شیگلا بوئیدی سروتایپهای 13 و 14 در این دو محیط گاز تولید می کنند.

b) تخمیر لاکتوز – شیگلاها لاکتوز را تخمیر نمی کنند. اما شیگلا سونئی لاکتوز را در انکوباسیون طولانی (بیش از 48 ساعت) تخمیر کرده و اسید تولید می کنند.

c) تخمیر مانیتول – سروتایپ های شیگلا دیسانتری ، شیگلا فلکسنری سروتایپ6 واریته Newcastele و شیگلا فلکسنری سروتایپ ۲b مانیتول را تخمیر نمی کنند، ولی سایر گونه های شیگلا مانیتول را تخمیر می کنند.

d) ONPG - شیگلا سونئی و 15% از شیگلا دیسانتری ها(سروتایپ 1)و 8% از شیگلا بوئیدی ها(سروتایپ 9)، ONPG مثبت اند. سایر گونه های شیگلا ONPG منفی می باشند.

e) تولید اندول – شیگلا سونئی ، شیگلا دیسانتری سرو تایپ1 و شیگلا فلکسنری سروتایپ6 اندول منفی اند. سایر گونه های شیگلا متفاوتند. (از نظر شیوع سویه های اندول منفی بیشتر جدا می شوند.)

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

2- تعیین سروگروه (Serogrouping)

انجام آزمایش با آنتی سرم برای تشخیص شیگلاها ضروری است. جنس شیگلا دارای 4 سروگروه یا زیر گروه می باشد:

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

سروگروه یا زیرگروه **A** دارای 15 سرو تایپ، **B** دارای 8 سروتایپ ، **C** دارای 19 سروتایپ و **D** فقط دارای یک سرو تایپ می باشد.

تعیین سروگروه (Serogrouping) به وسیله آگلوتیناسیون بر روی لام با آنتی سرمهای سوماتیک **O** شامل **poly A** ، **poly B** ، **poly C** ، **poly D** انجام می شود. از آنتی سرمهای مونووالان برای تشخیص اختصاصی سروتایپ ها استفاده می شود و **تعیین سروتایپ در آزمایشگاه های مرجع امکان پذیر است**.

در مواردی که سویه مورد آزمایش با آنتی سرم **poly group A** آگلوتینه ایجاد نماید، این سویه شیگلا دیسانتری می باشد و برای تعیین سروتایپ باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آن جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شود. سروتایپ 1 شیگلا دیسانتری (**Sd1**) همه گیری های گسترده، طولانی و شدید با مرگ و میر فراوان ایجاد می کند 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 سرمی استفاده نکنید. زیرا نتایج گمراه کننده ای بدست می آید.) بوسیله لوپ، آنس یا اپلیکاتور چوبی به طور جداگانه استریل کمی کلنی برداشته، ابتدا در قطره سرم فیزیو لوژی و سپس در قطره آنتی سرم سوسپانسیون یکنواختی تهیه کنید.لام را به مدت 30 ثانیه تا 1 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 آگلو تیناسیون باشد.

الف- اگر در قطره سرم فیزیولوژی ذرات آگلوتیناسیون ایجاد شود، واکنش آگلوتیناسون خودبه خودی است که به علت کلنی خشن (Rough)ایجاد می شود. 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 آن جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شود. گاهی استفاده از محیط های حاوی قند زیاد مانند TSI یا KIA می تواند باعث ایجاد آگلوتیناسیون خود به خودی شود. در این موارد کلنی را بر روی محیط بدون قند مانند بلاد آگار کشت داده و آزمایش آنتی سرم مجدد انجام شود.[6]

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 می باشد.

ج- در سویه های جداشده که از نظر واکنشهای بیوشیمیایی شبیه شیگلا هستند، اما با آنتی سرمهای پلی شیگلا آگلوتیته ضعیفی داده یا آگلوتیته نمی دهند، احتمال پوشیده شدن آنتی ژن سوماتیک (**O**) بوسیله آنتی ژن کپسولی وجود دارد. برای از بین بردن آنتی ژن کپسولی باید:

1- سوسپانسیون غلیظی از سویه جدا شده در سرم فیزیولوژی استریل تهیه نموده و در دمای 100 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه حرارت دهید.

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

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

تذکر:

1) تمام سویه هایی که از نظر بیوشیمیایی به عنوان شیگلا تشخیص داده می شوند 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.

2) همه آنتی سرمها باید قبل از استفاده جهت اطمینان از واکنش های 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 سویه های کنترل مثبت و منفی در راهنمای کنترل کیفی محیطهای کشت آمده است.

3- آزمایش تعیین حساسیت :

گاستروانتریت خفیف معمولاً بدون درمان آنتی بیوتیکی بهبود می یابد. به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی گسترده در بین سویه های شیگلا، برای تمام سویه های جدا شده باید آزمایش تعیین حساسیت میکروبی انجام شود. گزارش نتایج آزمایش تعیین حساسیت به پزشک برای شیگلا دیسانتری سروتایپ 1(Sdl)حائز اهمیت است. در بعضی نواحی آسیا و آفریقا سویه های Sdl به آنتی بیوتیک های رایج مانند نالید یکسیک اسید مقاوم شده است، اما هنوز به فلوروکینولونها مانند سیپروفلوکساسین حساسند. به طور معمول آمپی سیلین، تری متو پریم سولفامتوکسازول، یک فلوروکینولون مانند سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید آنتی بیوتیک های انتخابی برای آزمایش تعیین حساسیت و گزارش به پزشک می باشند.

تذکر:

هرچند نسل اول و دوم سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها(مانند جنتامایسن و آمیکاسین) ممکن است در محیط آزمایشگاه (invitro) برای گونه های شیگلا (وسالمونلا) حساس باشند، اما از نظر بالینی موثر نبوده و نباید استفاده و گزارش شوند.

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

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

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

سالمونلا:

جنس سالمونلا باسیلهای گرم منفی متعلق به خانواده انترو باکتریاسه بوده و در تقسیم بندی جدید دارای دو گونه می باشد: ***Salmonella enterica*** و ***Salmonella bongori*** . سالمونلا انتریکا به 6 زیر گونه تقسیم می شود: زیرگونه **I** تا **VI**. سویه های زیر گونه I معمولا از انسان و جانوران خونگرم جدا می شوند. این زیر گونه به عنوان ***S. enterica*** **Subsp. *enterica*** نام برده می شود. اکثر سویه های بیماریزای انسانی در این زیر گونه قرار دارند. سایر زیر گونه ها و گونه بنگوری در انسان بسیار نادرند و از جانداران خونسرد و محیط جدا می گردند.

نامگذاری سالمونلا:

نامگذاری جدید سویه های سالمونلا که در حال حاضر توسط CDC استفاده می شود، به صورت زیر می باشد:

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

2-نام گونه به صورت **ایتالیک** نوشته شود: مثلا" *enterica*

3-نام سروتایپ به صورت **غیر ایتالیک** و حرف اول آن با حرف بزرگ نوشته شود. مثلا" Typhi

با توجه به آنچه گفته شد معرفی سویه های زیرگونه I این چنین می باشد:

Salmonella enterica subspecies *enterica* serotype Paratyphi B

هر چند در این روش اصول و ضوابط کلی در نامگذاری رعایت شده است اما پزشکان و میکروب شناسان بالینی ، نامگذاری ساده ای را برای گزارش روزمره استفاده می کنند که در آن نام اختصاصی سروتایپ مقدم باشد :

Salmonella serotype Paratyphi B یا *Salmonella* Paratyphi B

باید توجه داشت که در اینجا نحوه نگارش Paratyphi B نشانه نام سروتایپ است، نه نام گونه(به مانند سایر باکتری ها).

همچنین سالمونلاها از نظر تست های بیوشیمیایی و نحوه گزارش اولیه به 3 گروه تقسیم می شوند(جدول 1):

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

کشت:

کلنی سویه های سالمونلا بر روی محیط **MAC** بی رنگ یا همرنگ محیط، HE آبی یا سبز- آبی با مرکز سیاه و XLD قرمز با مرکز سیاه می باشند.(در مواردی ممکن است تولید H_2S تا 48 ساعت بعد صورت بگیرد.)

1- تشخیص بیوشیمیایی:

کلنی های مشکوک به سالمونلا را می توان روی **KIA یا TSI** غربالگری نمود. لازم به ذکر است که جهت انجام تمامی تستهای تشخیصی بیوشیمیایی باید یک کلنی کاملا 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 1^{cc} -0/5سرم فیزیولوژی استریل تهیه و برای انجام همه تستهای بیوشیمیایی استفاده کنید. اگر کلنی کاملاً ایزوله روی محیط وجود ندارد می توانید از کلنی مشکوک برداشته روی پلیت دیگری streak نمایید تا کلنی های خالص به دست آید و سپس از آن برای تلقیح **KIA یا TSI** و سایر تستهای بیوشیمیایی استفاده کنید. محیط های **KIA یا TSI** را مطابق آنچه در مبحث شیگلا توضیح داده شد تلقیح و انکوبه نمایید.

اکثر سویه های سالمونلا بر روی این دو محیط واکنش **Alk/Acid , Gas+ , H_2S+** ایجاد می کنند. روی این دو محیط *Salmonella* Typhi واکنش **Alk/Acid بدون تولید گاز** و با مقدار **کم H_2S** در خط تلقیح آنس ایجاد می نمایند.

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

سویه هایی که با تست غربالگری فوق واکنشهای مشخص سالمونلا را ایجاد می کنند، باید با مجموعه ای از تستهای بیوشیمیایی تشخیص داده شوند (جداول 1،2 و فلوچارت 2) و با آنتی سرمهای پلیO ، گروه **A, B, C, D** مورد آزمون آنتی سرمی قرار گیرند. این سویه ها باید برای تایید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و 5٪ آن به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شوند.

جدول1 - تستهای بیوشیمیایی کاربردی در افتراق سالمونلا از سایر انتروباکتریاسه ها و تشخیص سالمونلا تایفی و سالمونلا پاراتایفیA[1]

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:

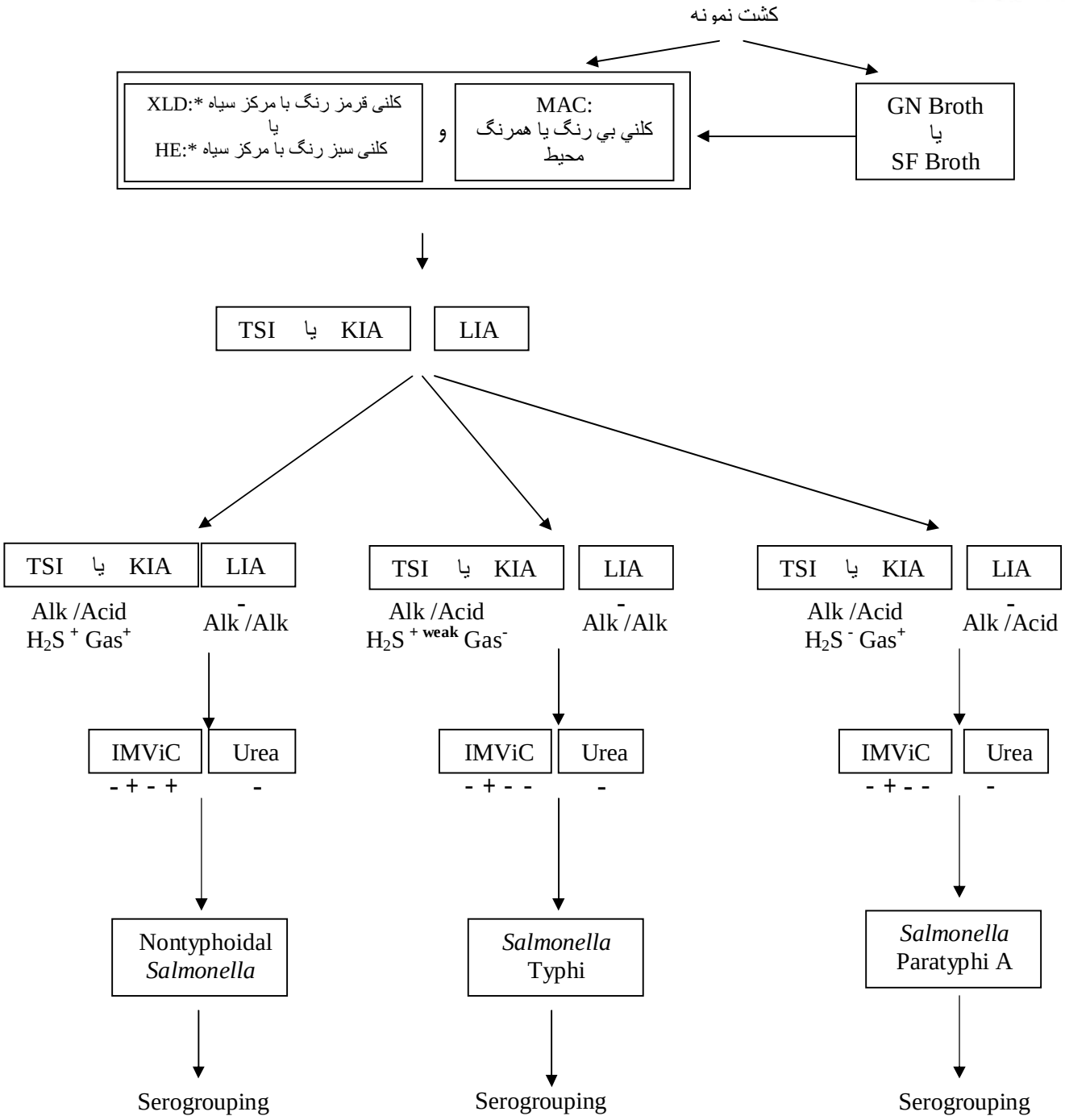
1-واکنش مثبت در 90% موارد بعد از 2-1 روز ایجاد می شود.

2-H_2S از روی محیط TSI گزارش می شود (نه SIM).

3-تولید گاز را بر روی TSI یا KIA می توان بررسی نمود.

4-سالمونلاها اندول منفی و اوره منفی(اوره آگار) هستند و در صورت مثبت شدن جنس سالمونلا رد می شود.

فلوچارت 2 : جداسازی،غربالگری و تشخیص بیوشیمیایی سالمونلا



توضیحات:

***رنگ سیاه در مرکز کلنی های سالمونلا بر روی محیطهای XLD و HE ممکن است بعد از 24ساعت اول انکوباسیون ایجاد شود.**

اگر سویه مورد آزمون از نظر واکنشهای بیو شیمیایی به طور مشخص شبیه سالمونلا است، اما با آنتی سرمهای سالمونلا آگلوتینه نمی دهد، سویه باکتریایی مورد آزمون باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آن جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شود.

از آن جایی که تولید **H_2S** یکی از واکنش های مهم درتشخیص سالمونلا می باشد، افتراق آن از سایر انتروباکتریاسه های **H_2S** مثبت حائز اهمیت است.

جدول 2 _تستهای بیوشیمیایی تشخیصی مهم جهت افتراق سالمونلا از سایر انتروباکتریاسه های **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:

1-به علت تشابه سیترو باکتر با سالمونلاها در آنتی ژنهای **O, H**یا **Vi** تشخیص بیوشیمیایی سالمونلا قبل از استفاده از آنتی سرم بسیار حائز اهمیت است.

2-در مواردی که نیاز به تشخیص سریع باشد، توصیه می گردد تست های بیوشیمیایی فلوچارت 2 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 بیو شیمیایی تشخیص سالمونلا:

a) تولید **H_2S** - اکثر سالمونلاها در محیط **KIA** و **TSI** ، **H_2S** تولید می کنند. اما سروتایپ پاراتایفی A و 50% از سویه های کلراسوئیس **H_2S** منفی اند.

b) تولید گاز در **KIA یا TSI** - سالمونلا ها در این دو محیط گاز تولید می کنند. اما سالمونلا تایفی و سالمونلا گالیناروم استثناهای مهمی هستند و هرگز گاز تولید نمی کند.

c) سیترات- اکثر سالمونلا ها از سیترات به عنوان منبع کربن استفاده می کنند، اما برخی از سروتایپ ها مانند تایفی ، پاراتایفیA ، گالیناروم و پولوروم و اکثر سویه های سالمونلا کلرا سوئیس سیترات منفی اند.

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

e) حرکت- سالمونلاها حرکت مثبت اند، به استثناء سالمونلا گالیناروم (**Gallinarum**) و پولوروم(**Pullorum**) که غیر متحرک اند.

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

2- تعیین سروگروه (Serogrouping)

استفاده از آنتی سرم در تشخیص سالمونلاها ضروری است. تعیین سروگروه به وسیله آگلوتیناسیون بر روی لام با آنتی سرمهای **O**(سوماتیک) انجام می شود. آنتی سرمهای پلی **O** مورد استفاده در تعیین سروگروه سالمونلا شامل آنتی سرمهای گروه **A** تا **E** می باشد، زیرا حدود 95٪ از سویه های 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 آنجاییکه در آزمایشگاههای بهداشتی فقط آنتی سرمهای پلی**O** ، گروه **A ,B, C, D** موجود است، پس از تعیین اولیه سروگروه، سویه سالمونلا برای مراحل سروتایپینگ که نیاز به آنتی سرمهای H (فلاژله) و Vi (کپسولی) می باشد، به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال می گردد.

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 آن جا به آزمایشگاه همکار دانشکده بهداشت دانشگاه تهران یا انستیتو پاستور (مرجع کشوری E.coli) ارسال شود:

- اگر سویه مورد آزمون از نظر واکنشهای بیو شیمیایی به طور مشخص شبیه سالمونلاها هستند، اما با آنتی سرمهای سالمونلا آگلوتینه نمی دهند.
- اگر سویه مورد آزمون از نظر واکنشهای بیوشیمیایی همه مشخصه های سالمونلا را ندارد، اما با آنتی سرمهای **O** سالمونلا آگلوتینه ایجاد میکند.

3_آزمایش تعیین حساسیت :

درمان ضد میکروبی برای موارد گاستروانتریت خفیف سالمونلایی پیشنهاد نمی شود، چون باعث طولانی شدن دوره ناقل بودن می گردد. همچنین آزمایش تعیین حساسیت میکروبی برای سویه های جدا شده از مدفوع جهت درمان توصیه نمی گردد. اما تعیین الگوی مقاومت ضد میکروبی با اهداف پایش گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های 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 بیوتیک های انتخابی جهت آزمایش تعیین حساسیت برای گونه های سالمونلا جدا شده از مدفوع و گزارش به پزشک می باشد. لازم به ذکر است در مواردی که نالیدیکسیک اسید مقاوم و سیپروفلوکساسین حساس باشد، احتمال ایجاد مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین در حین درمان وجود دارد. این مورد باید به پزشک اطلاع داده شود، خصوصا" در عفونتهای مهاجم و باکتریهای جدا شده از کشت خون.

در مواردی که عفونت از کشت خون جدا می شود، نسل سوم سفالوسپورین ها و کلرامفنیکل نیز تعیین حساسیت می شود.

تذکر: هر چند نسل اول و دوم سفالوسپورین ها و آمینو گلیکوزیدها (مانند جنتامایسین و آمیکاسین) ممکن است در محیط آزمایشگاه(invitro) برا ی گونه های سالمونلا (وشیگلا) حساس گزارش شوند، اما از نظر بالینی موثر 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 بررسی های به عمل آمده توسط **CDC** در سال 2000 میلادی 50٪ از گونه های سالمونلا تایفی موریوم(سروگروپB) جدا شده از نمونه های بالینی به یک یا بیش از یک آنتی بیوتیک و 28درصد آنهابه پنج آنتی بیوتیک مقاوم بوده اند. در سال 2001 ، 26٪ از سالمونلا نیوپورت های جدا شده (سروگروپ**C**)، حداقل به 9 آنتی بیوتیک مقاوم بوده اند. در ایران اطلاعات کافی در مورد مقاومتهای چند گانه در سالمونلا وجود ندارد. در مواجهه با چنین مواردی، سویه مورد نظر 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.

ه) گزارش نتایج:

a)در موارد کشت مثبت :

- گزارش باکتری جداشده پس از شناسایی، به صورت نیمه کمی بر اساس تعداد کلنی های رشد کرده بر روی پلیتهای اولیه می باشد، (**Light, Moderate, Heavy**)

مانند: "**Heavy growth of Nontyphoidal *Salmonella* serogroup D isolated**."

b)در موارد کشت منفی :

- به این طریق گزارش نمایید :

"**No Solmonella and Shigella isolated**."

جدول خصوصیات تشخیصی کلیدی انتروباکتریاسه های شایع

	KIA	GAS	H_2S	MR	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOT	LYS	ARG	ORN	ONPG
Tribe I: *Escherichieae*														
Genus: Escherichia														
E. coli	A/A	+	−	+	−	+	−	−	−	+	+	−/+	+/−	+
Genus: Shigella														
Groups A, B, C	Alk/A	−	−	+	−	−/+	−	−	−	−	−	−	−	−
S. sonnei	Alk/A	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
Tribe II: *Edwardsielleae*														
Genus: Edwardsiella														
E. tarda	Alk/A	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	−	+	−
Tribe III: *Salmonelleae*														
Genus: Salmonella	Alk/A	+	+	+	−	−	+	−	−	+	+	+/−	+	−
Tribe IV: *Citrobactereae*														
Genus: Citrobacter														
C. freundii	A/A; Alk/A	+	+	+	−	−	+	−	+/−	+	−	+/−	−/+	+
C. koseri	Alk/A	+	−	+	−	+	+	−	+/−	+	−	+/−	+	+
Tribe V: *Klebsielleae*														
Genus: Klebsiella														
K. pneumoniae	A/A	++	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	+
K. oxytoca	A/A	++	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+
Genus: Enterobacter														
E. aerogenes	A/A	++	−	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+
E. cloacae	A/A	++	−	−	+	−	+	−	+/−	+	−	+	+	+
Genus: Hafnia														
H. alvei	Alk/A	+	−	−/+	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+
Genus: Pantoea														
P. agglomerans	A/A; Alk/A	−/+	−	−/+	+/−	−/+	+/−	−/+	−/+	+	−	−	−	+
Genus: Serratia														
S. marcescens	Alk/A	+	−	−/+	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+
Tribe VI: *Proteeae*														
Genus: Proteus														
P. vulgaris	Alk/A	+/−	+	+	−	+	−/+	+	++	+*	−	−	−	−
P. mirabilis	Alk/A	+	+	+	+/−	−	+/−	+	++	+*	−	−	+	−
Genus: Morganella														
M. morganii	Alk/A	+	−	+	−	+	−	+	++	+	−	−	+	−
Genus: Providencia														
P. rettgeri	Alk/A	−	−	+	−	+	+	+	++	+	−	−	−	−
P. stuartii	Alk/A	−	−	+	−	+	+	+	−/+	+/−	−	−	−	−
P. alcalifaciens	Alk/A	+/−	−	+	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−
Tribe VII: *Yersinieae*														
Genus: Yersinia														
Y. enterocolitica	Alk/A	−	−	+	−	+/−	−	−	+/−	−†	−	−	+	+

KIA, Kligler's iron agar; H_2S, hydrogen sulfide; MR, methyl red; VP, Voges-Proskauer; IND, indole; CIT, citrate; PAD, phenylalanine deaminase; URE, urease; MOT, motility; LYS, lysine; ARG, arginine; ORN, ornithine; ONPG, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside; ++, strong positive reaction; +, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; +/−, 50–90% of strains positive; −/+, 50–90% of strains negative; shaded areas indicate key reactions.

** Swarming motility demonstrated on noninhibitory media.*

† Nonmotile at 36°C, motile at 22°C.

مراجع:

1. Murray, P.R.et al; Manual of Clinical Microbiology, ASM, 8th edition, 2003
2. Connie, R.mahon; Textbook of Diagnostic Microbiology, 3th edition, 2007
3. Koneman, E.W.et al; Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott, 6th edition, 2006
4. Isenberg, H.D; Essential Procedures for Clinical Microbiology, ASM, 1998
5. Isenberg, H.D; Clinical Microbiology Procedures Handbook, ASM , 2004
6. Forbes, A.B; Baily & Scott's; Diagnostic Microbiology, 12th edition, 2007
7. CLSI; Performance Standard for Antimicrobial Susceptibilily Testing, 16th Information Supplement, M100-S16, 2006
8. روشهای آزمایشگاهی مورد استفاده در تشخیص همه گیری های وبا و اسهال خونی، مراکز کنترل و پیشگیری از بیماریهای آمریکا، سازمان جهانی بهداشت، ترجمه دکتر کامران حکیم زاده، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، مرکز مدیریت بیماریها