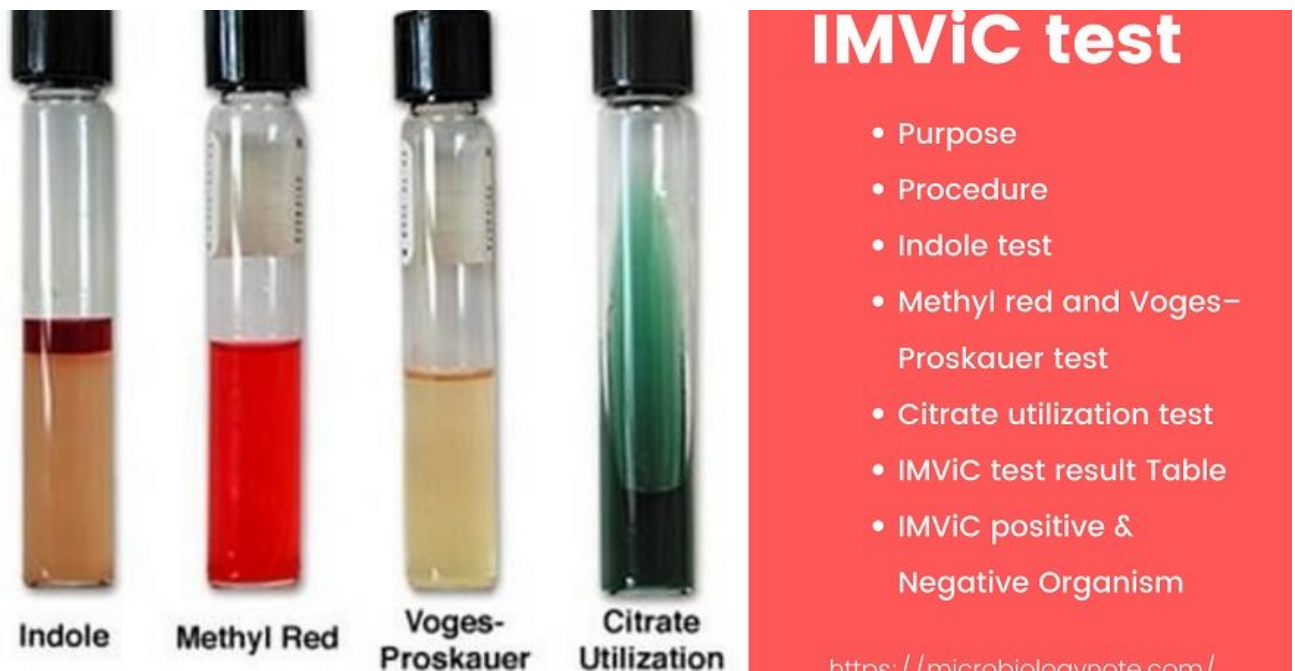


تشخیص افتراقی باکتریهای کلیفرم



شناسایی باکتری‌هایی که شامل گروه کلیفرم هستند گاهی برای تعیین ماهیت آلودگی ضروری است. آزمایشهای افتراقی برای شناسایی باکتریهای فوق باید با این آگاهی انجام گیرد، که تمام سویه‌های طبقه‌بندی شده که به گروه کلیفرم نسبت داده شده ضرورتاً نمی‌تواند با تعریف اعلام شده در این دستور کار کاملاً مطابقت داشته باشد. زیرا برخی از باکتریها ممکن است لاکتوز را تخمیر نکنند و یا در صورت تخمیر گاز تولید نکنند. علاوه بر این باکتریهای گرم منفی دیگر بجز کلیفرم‌ها، لاکتوز را تخمیر کرده و روی محیط کشت تولید درخشش می‌کنند (نظیر گونه‌های آئروموناس). اما تمام سویه‌های یک گونه واکنش یکسانی در محیط کشت نخواهند داشت. ارگانیزم‌ها جهش یافته، صدمه دیده و تغییر پذیر ممکن است به آزمایش‌ها پاسخ متفاوتی بدهند. هر چند آزمایش‌های متداول IMViC (یعنی ایندول، متیل رد، وگس پرسکوئر و معرف سیتрат) برای تشخیص افتراقی کلیفرم‌ها مفید است اما شناسایی کاملی را فراهم نکرده و برای دستیابی به نتایج دقیق به آزمایش‌های بیوشیمیایی بیشتری نیاز است.

۱-۳- خالص سازی کشت میکروبی

دست‌یابی به یک کشت خالص هنگامی حاصل می‌شود که از مرکز یک پرگنه (کلنی) کاملاً ایزوله شده نمونه‌ای برداشته و سپس روی پلیت

های تریپتون سوی آگار یا نوترینت آگار بصورت خطی کشت داده شود. اگر یک بخش از کلنی برداشته شده ابتدا در پپتون مایع (براث) یا آب مقطر امولسیونه (تلقیح) شده باشد و سپس کشت خطی داده شود توزیع بهتری از کلنی هادر پلیت های دوم حاصل می گردد. هنگامی که برداشت یک کلنی از کشت اولیه صورت می گیرد باید توجه داشت برخی از میکرو ارگانیزم هایی که کلنی مجزا ایجاد نکرده اند ممکن است سلول های کلنی مورد نظر را احاطه کرده باشند. در این مواقع کشت های ثانویه را در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری کرده و برای اطمینان از وجود تنها باسیل های گرم منفی بدون اسپور، بر روی یک کلنی منفردی که به خوبی ایزوله شده باشد آزمایش رنگ آمیزی گرم انجام می گیرد. همچنین می توان اکسیداز منفی بودن کشت میکروبی را تعیین نمود. باسیل های بدون اسپور گرم منفی، اکسیداز مثبت باکتریهای کلیفرم نیستند اما ممکن است آئروموناس باشند که به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی محسوب نمی شوند.

گاهی تنوع و تغییر در ارگانیزم های گروه کلیفرم مشاهده می گردد و واکنشهای مخلوط در محیط کشت افتراقی می تواند بیانگر این تغییرات در کشت خالص باشد. واکنشهای مثبت - منفی پایدار در محیط های کشت افتراقی یک کشت مخلوط را نشان می دهد که حاصل خالص سازی نامناسب است.

۳-۱-۲- روش آزمایش های تشخیص افتراقی (IMViC)

۳-۱-۲-۱- آزمایش ایندول

مقدمه: ایندول محصول متابولیسم تریپتوفان است. آنزیم تریپتوفاناز، تریپتوفان موجود در پپتون و سایر ترکیبات محیط کشت را به ایندول، اسکاتول و ایندول استیک اسید تبدیل می کند.

مواد و وسایل مورد نیاز:

۱- محیط های کشت INM یا تریپتیکاز پپتون براث (تریپتوفان براث)

۲- معرف کواکس (پارا دی متیل آمینو بنزآلدئید) که برای تهیه آن به روش زیر عمل می کنیم: ۵ گرم پارا دی متیل آمینو بنزآلدئید را در ۷۵ میلی لیتر الکل ایزو آمیل (یا نرمال آمیل) حل کرده و ۲۵ سی سی HCL غلیظ به آن اضافه می کنیم. معرف باید زردرنگ بوده و PH کمتر از ۶ باشد.

۳-لوله های آزمایش و جالوله ای و پلیت

۴-چراغ الکلی، آنس یا لوپ، پیپت و پوآر

روش انجام آزمایش:

۱- پس از برداشتن یک کلنی از محیط کشت EMB آن را در لوله های حاوی محیط کشت تریپتوفان برآث وارد می کنیم.

۲- به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

۳- در پایان این مدت به هر لوله ۰.۲ تا ۰.۳ میلی لیتر محلول معرف (واکنش گر) اضافه نموده و تکان می دهیم، ۱۰ دقیقه صبر کرده و سپس نتایج را مشاهده می کنیم.

۴- تشکیل رنگ قرمز تیره در لایه سطحی آمیل الکل، نشاندهنده پاسخ مثبت به آزمایش ایندول است. در صورتی که رنگ اصلی محلول حفظ شده باشد نتیجه آزمایش ایندول منفی است. رنگ نارنجی احتمالا نشاندهنده حضور اسکاتول ناشی از تجزیه ایندول می باشد.

۳-۱-۲-۲-آزمایش متیل رد

تئوری آزمایش: این آزمایش PH نهایی را اندازه گیری می کند، یعنی به بررسی تولید اسید حاصل از تجزیه گلوکز به وسیله باکتریها می پردازد. واکنش های متابولیکی که به وسیله تولید گاز و آزمایش های متیل رد و وکس پرسکوئر مشخص می گردد، با یکدیگر بستگی داشته و در شناسایی افتراقی اعضای گروه کلیفرم مفیدند.

مواد و وسایل مورد نیاز:

۱- محیط کشت MRVP

۲- معرف متیل رد (که به صورت آماده وجود دارد)

۳-لوله های آزمایش و جالوله ای و پلیت

۴-چراغ الکلی، آنس یا لوپ، پیپت و پوآر

روش انجام آزمایش:

۱- ابتدا محیط MRVP را طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آماده و استریل می نمائیم.

۲- ابتدا یک آنس از باکتری را در لوله حاوی محیط کشت MRVP کشت داده و نمونه ها را در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

۳- پس از ۳ تا ۵ روز گرماگذاری، به هر لوله ۵ قطره محلول شناساگر قرمز متیل اضافه می کنیم.

۴- مشاهده رنگ قرمز مشخص بیانگر پاسخ مثبت به آزمایش متیل رد و رنگ زرد واضح بیانگر پاسخ منفی برای آزمایش متیل رد است. سایه ی رنگی مبهم و نامشخص به عنوان نتیجه مشکوک و احتمالاً عدم خالص سازی درست کشت میکروبی می باشد.

۵- با بررسی روزانه کشت های میکروبی (در روزهای ۲، ۳، ۴ و یا ۵) گاه می توان موارد مثبت را زودتر از موعد مشاهده نمود.

۳-۱-۲-۳- آزمایش وکس پرسکوئر

تئوری آزمایش: این آزمایش برای تعیین استوئین که به صورت متابولیکی به وسیله برخی از باکتریهای کلیفرم در محیط پپتون-گلوکز تولید می شود، پیشنهاد شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز:

□- محیط کشت MRVP

۲- پتاس ۴۰ درصد و آلفا نفتول

۳- لوله های آزمایش و جالوله ای و پلیت

۴- چراغ الکی، آنس یا لوپ، پیت و پوآر

روش انجام آزمایش:

۱- ابتدا محیط MRVP را طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آماده و استریل می نمائیم.

۲- از کلنی های باکتری در محیط EMB یک آنس برداشته و در محیط MRVP کشت می دهیم.

۳- به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده در پایان مدت به یک میلی لیتر از محیط کشت میکروبی ۰٫۶ میلی لیتر محلول آلفا نفتول و ۰٫۲ میلی لیتر محلول پتاس ۴۰ درصد اضافه می کنیم.

۴- تشکیل رنگ صورتی تا قرمز لاکه طرف ۵ دقیقه بیانگر پاسخ مثبت به آزمایش است.

۵- از خواندن رنگ بعد از مدت ۵ دقیقه اجتناب می کنیم. همچنین لوله هایی که در آنها رنگ مسی تشکیل شده را کنار می گذاریم.

۳-۱-۲-۴- آزمایش سیترا سديم

تئوری آزمایش: این آزمایش توانایی باکتریها در مصرف سیترا به عنوان تنها منبع کربن را بررسی میکند.

مواد و وسایل مورد نیاز:

۱- محیط کشت سیمون سیترا

۲- لوله های آزمایش، جالوله ای و پلیت

۳- چراغ الکی، آنس یا لوپ، پیت و پوآر

روش انجام آزمایش:

۱- ابتدا محیط سیمون سیترا آگار را طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آماده و استریل می نمائیم.

۲- از کلنی های مشخص در محیط EMB توسط آنس سوزنی برداشته و در محیط کشت شیبدار سیمون سیترا به صورت عمقی و سطحی کشت داده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

۳- رشد روی محیط که معمولا به رنگ آبی است (یا کدر شدن محیط کشت) به عنوان پاسخ مثبت و عدم رشد را به عنوان پاسخ منفی در نظر میگیریم.

۳-۱-۲-۵- آزمایش حرکت:

تئوری آزمایش: بررسی حرکت باکتریها در محیط هایی مثل SIM یا موتیلیتی مدیوم انجام می گیرد. به علت اینکه این محیط دارای آگار حدود ۲٫۵ تا ۳٫۵ درصد باشد، باکتری هایی که دارای تازک هستند قادر به نفوذ در بین مواد این محیط خواهند بود. بنابراین اگر با آنس سوزنی باکتری را بطور عمودی در این محیط ها فرو ببریم و کشت بدهیم، چون این دو محیط بصورت آگار تال تهیه می شوند، اگر

باکتری تازه داشته باشد در رد آنس چیزی مشاهده نمی گردد و تمامی محیط کدر می شود که این کدورت بستگی به نوع باکتری از نظر تعداد تازه دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز:

۱- محیط های کشت SIM یا موتیلیتی مدیوم

۲- لوله های آزمایش، جالوله ای و پلیت

۳- چراغ الکی، آنس، پیت و پوآر

روش انجام آزمایش:

۱- ابتدا محیط SIM را طبق دستورالعمل کارخانه سازنده آماده و استریل می نمائیم.

۲- یک آنس از محیط کشت باکتری در محیط EMB برداشته و در سطح بالایی محلول کشت تا عمق ۵ میلیمتر تلقیح را انجام می دهیم. سپس لوله ها را به مدت ۱ تا ۲ روز در ۳۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری می نماییم، اگر پس از این مدت پاسخ منفی بود، ۵ روز دیگر در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری را ادامه می دهیم.

۳- مشاهده رشد انتشار یافته در محیط کشت از نقطه فرو بردن آنس سوزنی بیانگر پاسخ مثبت است.

۴- به جای این کار می توانیم محیط کشتی بدون آگار تهیه کرده و آزمایش را با کشت میکروبی تازه و جوان با استفاده از روش قطره معلق روی لام برای ارگانیزم های متحرک انجام دهیم (Hanging Drop Slide Technique).

۲-۳- تست حضور و غیاب کلیفرم ها:

تئوری آزمایش:

جهت تست احتمالی می توان از یک تست دیگر استفاده نمود که در محیطی به نام present absent می باشد. این تست، تست حضور و غیاب ((P/A جهت تشخیص کلیفرم ها در آب نیز نامیده میشود. روش P/A روش ساده اصلاح شده تخمیر چند لوله ای استاین روش وجود یا عدم وجود کلیفرم ها در آب می باشد. از مزایای آن می توان به انجام آزمایش روی تعداد زیاد نمونه در واحد زمان و نیز سهولت انجام آزمایش

اشاره کرد.

برای این منظور از محیط کشت P/A که به شرح زیر آماده می گردد استفاده میکنیم:

مواد مورد نیاز:

۱- لاکتوز براث (هیدراته): ۱۳ گرم

۲- لوریل تریپتوز براث (هیدراته): ۱۷٫۵ گرم

۳- بروموکروزول ارغوانی: ۰٫۰۰۸۵ گرم

۴- آب مقطر: ۱ لیتر

نکته: به علت اینکه مقدار نمونه مورد آزمایش، ۱۰۰ میلی لیتر می باشد، همچنین مقدار محیط کشت ۵۰ میلی لیتر می باشد، در نتیجه غلظت محیط کشت باید سه برابر باشد پس اعداد فوق ضربدر سه خواهد شد.

روش آزمایش:

۱- در ابتدا لاکتوز براث و لوریل تریپتوز براث را بدون استفاده از گرما در آب حل مینماییم.

۲- برومو کروزول ارغوانی را در ۱۰ میلی لیتر سود ۰٫۱ نرمال حل کرده و به محلول آبگوشت اضافه می کنیم.

۳- میلی لیتر از محیط کشت آماده شده را در داخل بطری ۲۵۰ سی سی درب دار می ریزیم.

۴- بطری حاوی محیط کشت را به مدت ۱۲ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد در اتوکلاو استریل می کنیم. (PH=6.8)

۵- از نمونه مورد نظر پس از ۲۵ بار به هم زدن، ۱۰۰ میلی لیتر برداشته و داخل بطری حاوی محیط کشت می ریزیم، بطری را آنقدر تکان میدهیم تا در داخل آن نمونه و محیط کشت به طور یکنواخت مخلوط گردند.

۶- بطری حاوی نمونه و محیط کشت را در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار می دهیم.

۷- تشکیل رنگ زرد در محیط نشان دهنده شرایط اسیدی در نتیجه تخمیر لاکتوز است. اگر گاز نیز تولید شود با تکان دادن بطری به آرامی و ایجاد کف در محیط می توان به وجود آن پی برد.

۸- برای تست تاییدی تمام محیط های کشتی که واکنش اسیدی (زردرنگ) یا گازی داده اند را به محیط BGB منتقل کرده و در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار می دهیم وجود گاز در محیط BGB نشانه دهنده (+) بودن واکنش است