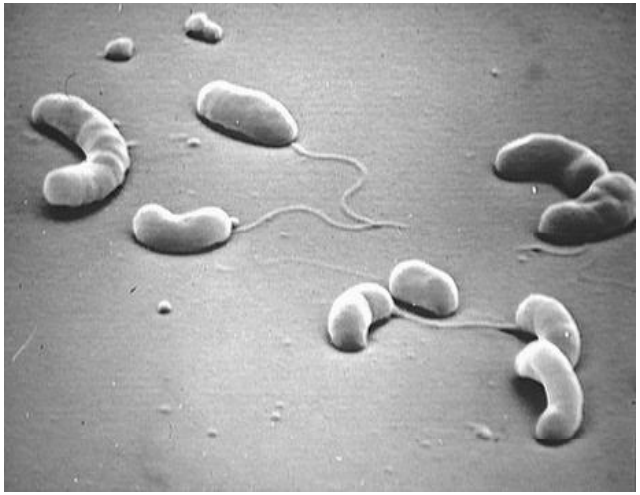
تشخیص آزمایشگاهی ویبریو کلرا

و روشهای نمونه برداری



قسمت دوم – مطالب تکمیلی

نمونه برداری و انتقال :

کل ۲ ـ ۱. محیط انتقال نیمه‌جامد کَری‌بِلِر

- نمونه گیری باید در ۴ روز اول بیماری و قبل از مصرف آنتی بیوتیک باشد.

نمونه های مشکوک : (مدفوع – رکتال سواب – بافت آلوده)

با استفاده از سواب مرطوب نمونه را در محیط ترانسپورت Cary-blair قرار داده و باید ظرف ۴۸ ساعت (ترجیحا در ۴ درجه) به آزمایشگاه منتقل گردد.

اگر محیط ترانسپورت در دسترس نباشد ، نوار های کاغذ خشک کن و یا..... را به مدفوع آبکی آغشته نمود و در کیسه پلاستیکی در بسته به آزمایشگاه انتقال داد .

(ویبریو ها حساس به خشکی اند)

محیط کری بلر: Cary blair medium

محیط انتقالی : عوامل بیماریزای منتقله از آب و غذا

(*Shigella – E .coli – Vibrio*)

مزایا : - نگهداری ویبریوها به مدت ۴ هفته خارج از یخچال

- جهت نگهداری شیگلا باید حتما در یخچال باشد.

محیط آماده کری بلردر خارج از یخچال تا ۲ سال قابل نگهداری است اما...

❖ توجه:

برخی محیط ها (طبق دستورالعمل سازنده) احتیاج به کلرید کلسیوم ۱٪ دارند .

کشت وجدا سازی :

- بعد از انتقال به آزمایشگاه
برای افزایش تعداد ویبریوها و کاهش فلورمیکروبهای روده ای از محیط غنی کننده آب پپتونه قلیایی (APW) با PH=8/4 -8/6 و دارای نمک 10 g/l استفاده میشود.
- این محیط باید در دمای ۸-۲ درجه در یخچال نگهداری شود.

بعد از تلقیح نمونه در پیچ لوله را نیمه باز گذاشته و به مدت ۸-۶ ساعت در ۳۷ درجه قرار داده و بعد از آن بوسیله لوپ از قسمت بالایی لوله برداشته و در محیط انتخابی کشت میدهیم .

- محیط آب پپتونه را نباید بهم زد و یا مخلوط نمود .
- در صورت عدم حفظ شرایط کشت در این مدت ، بعد از ۱۸ ساعت میتوان مجدداً در APW دوم برده و در ۸-۶ بعدی در محیط انتخابی کشت داد .

محیط کشت انتخابی ویبریوکلرا:

(Thiosulfate Citrate Bile Salt agar)= TCBS

Sucrose / Bromthymol blue

- بعداز ۲۴ ساعت (در دمای ۳۵ درجه) کلنی های زرد براق در TCBS و کلنـی های بـی رنگ لاکتوزمنفی در Mac Conkey رشـــد می کنند.

علاوه براین میتوان ازمحیط های غیر انتخابی مانند Blood Agar, Chocolate Nutrient agar, Agar : MacConkey جهت کشت استفاده کرد .

محیط TCBS

- کلنی ها در محیط N.A دارای سطح صاف ودر محیط B.A دارای همولیز میباشند.

TCBS medium

طبق دستورالعمل های موجود این محیط نیازی به اتو کلاو ندارد.

- از زمان تهیه محیط نباید بیش از یک هفته گذشته باشد.

- در صورتیکه پلیت ها در کیسه فریزر نگهداری شود ، از خشک شدن جلوگیری شده و ماندگاری آنها بیشتر میشود.

تشخیص افتراقی :

کلنی های مشکوک بروی TCBS را باید روی محیط KIA ویا TSI کشت داد.

Kligler Iron Agar

یک محیط دو قندی شامل گلوکز و لاکتوز است که باید صورت شیبدار تهیه شود (عمق ۳ سانت و شیب ۳ سانت) و در دمای ۸-۲ درجه نگهداری شود .

واکنش ویبریوها درآن به صورت ALK/A بدون تولید گاز و SH_2 منفی است .

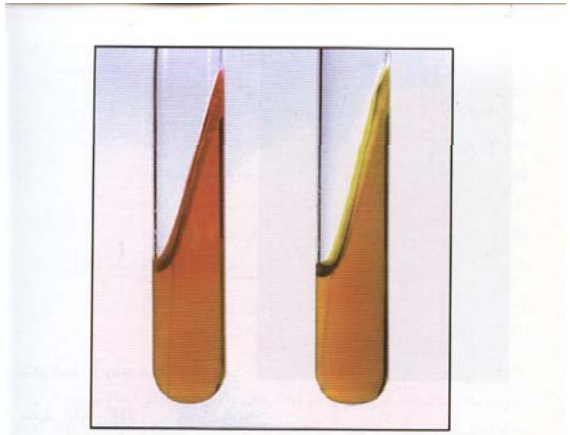
این محیط ها به علت داشتن کربوهیدرات سبب تقویت بروز آنتی ژنهای ویژه میشود

لذا جهت آزمایشات سرولوژی از روی این محیط ها باید نمونه برداشت.

←در تمام مراحل کشت نباید شرایط بیهوازی ایجاد گردد.

←کشت باید به صورت سطحی و عمقی باشد.

←پس از ۲۴-۱۸ ساعت باید محیط ها بررسی شود زیرا...



شکل ۶ـ ۶. واکنش‌های ویبریوکلرا در KIA (چپ) و TSI (راست).

Triple Suger Iron agar

یک محیط سه قندی شامل گلوکز ، لاکتوز و سوکروز است و واکنش ویبریوها درآن به صورت A/A بدون تولید گاز و SH_2 منفی است.

Wurster’s blue test : تست اکسیداز :

از کلنی های رشد کرده روی B.A ,N.A, KIA باید تست اکسیداز انجام داد.

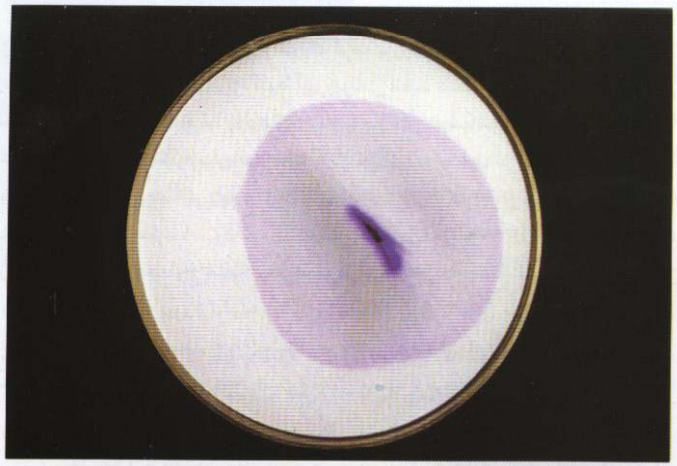
توجه " از محیط TCBS استفاده نکنید !

این تست در *V .cholerae* مثبت است .

و کنترل منفی : ازباکتری *E .coli* استفاده کنید.

معرف اکسیداز : پودر اکسیداز ۱درصد که باید به صورت روزانه تهیه شود.

روش انجام آزمایش :



شکل ۶ـ۴. آزمون مثبت اکسیداز(در اینجانشان داده‌شده‌است) در مدت ۱۰ ثانیه موجب پدیدآمدن رنگ ارغوانی تیره می‌شود. *ویبریوکلرا* اکسیداز مثبت است.

آزمایشات سرولوژی :

- جهت تست سرولوژی حتما باید از کلنی های تازه روی محیط KIA , N.A برداشت شود .

روش انجام آزمایش :

ابتدا مقداری از کلنی را با اپلیکاتور چوبی برداشته و در دو قطره نرمال سالین در روی لام حل کرده تا یک سوسپانسیون یکنواخت تهیه شود .

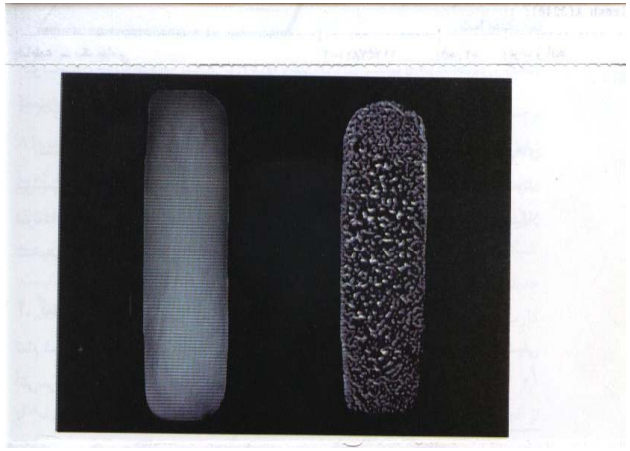
سپس یک قطره از آنتی سرم را اضافه کرده ودر مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه بررسی میکنیم .

در صورت ایجاد آگلوتیناسیون واکنش مثبت است .

- جهت استفاده از آنتی سرم های اختصاصی اگاوا و اینابا قبلا باید واکنش با آنتی سرم پلی والان مثبت شده باشد .

- آگلوتیناسیون باید سریع و قوی اتفاق بیفتد .

- در صورتیکه واکنش با آنتی سرم ها منفی شود و... باید به ویبریو ناگ (NAG) مشکوک شد که باید به تایید آزمایشگاه مرجع برسد.

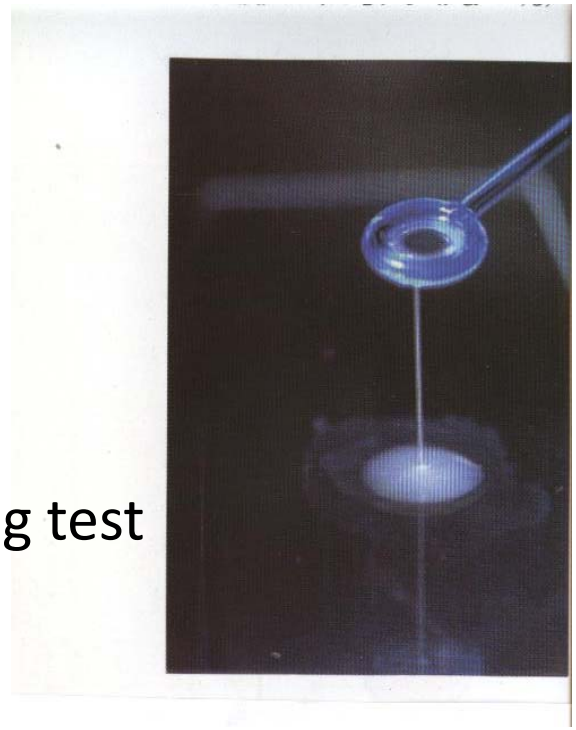


واکنش مثبت **واکنش منفی**

آزمون رشته :

دراین تست از محلول آبی ۰/۵ در صد دزوکسی کلات سدیوم استفاده میشود.

با حل کردن مقداری از کلنی تازه *V .Cholerae* در این محلول باکتریها لیز شده و محلول کدر و لزج میشود که درصورتیکه با لوپ به آرامی کشیده شود ایجاد یک رشته موکوئیدی مینماید.



String test

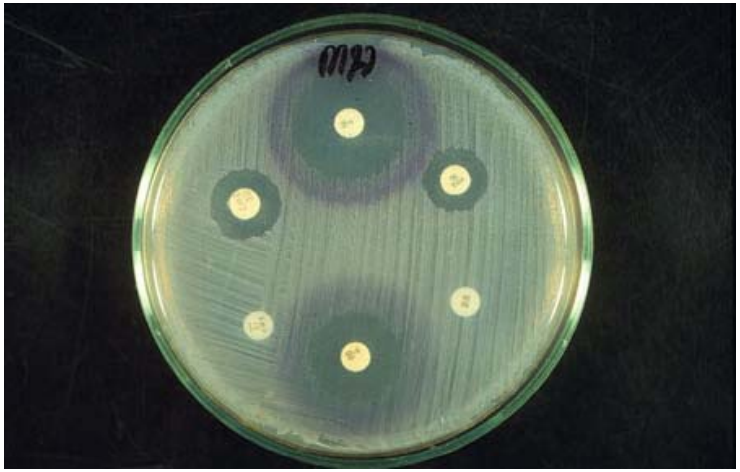
از دیگر تست های افتراقی که در تشخیص *V.Cholerae* کمک کننده هستند :

Biotype	Classic*	Eltor*
* Polymyxin B sen.	+	-
* Voges-Proskauer	-	+
* Bacteriophage IV sen.	+	-
string test	+	+
Indol /sucrose	+	+
Urease	-	-
Arginin Dehydrolase	-	-
Lysin Decarboxylase	+	+
Ornithin Decarboxylase	+	+
Arabinose	-	-
ONPG	+	+
Manitol	+	+

تست تعیین حساسیت میکروبی :

در آنتی بیوگرام *V .Cholerae* باید از تکنیک Kirby-Bauyer استفاده شود.
لذا باید از محیط کشت Muller Hinton استفاده کرد ،
که بعد از انکوباسیون واندازه گیری قطر هاله عدم رشد میتوان حساسیت باکتری را تعیین کرد.
آنتی بیوتیک های تائید شده در این روش شامل :

1. Ampicillin
2. Nalidixic acid
3. Tetracyclin
4. Furazolidon
5. Co-trimoxazole
6. Ciprofloxacin



Vibrio. cholerae O139

عامل اپیدمی سال ۱۹۹۲ در هند وبنگلادش: {100,000 dis-15000 dead}

← چون با ۱۳۸ سروگروپ شناخته شده تشابهی نداشت بنام **O139** خوانده شد.

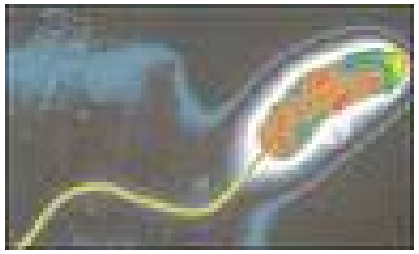
ویژگی: – مصرف غذاهای دریایی خام ونیم پخته آلوده (میگو– صدف – خرچنگ)

– عامل عفونت های خارج رودهای : زخم ها ، گوش خارجی ، دستگاه تنفس و ادراری

– فاقد توکسین کلراژن از نوع O1

– عدم واکنش با آنتی سرم پلی والان

– مقاوم به ترکیب O129 (Vibriostatic)



Virulance factor :

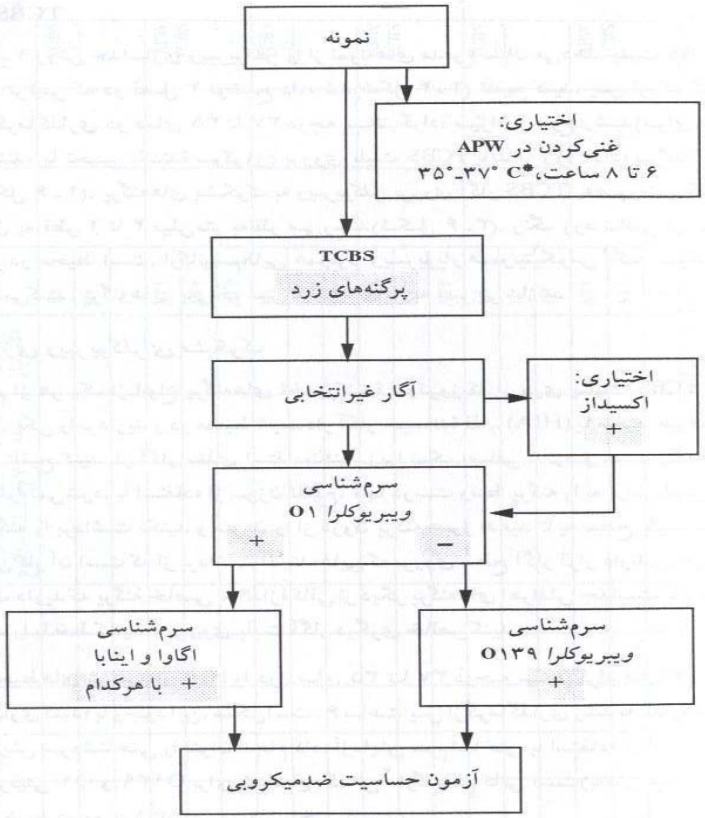
-Capsule LPS → Bacterimia

-With pilli (TePA Ag.) → Colonization in mocosal layer

-Entrotoxin : → Detectable in stool

-Hemagglutinin , Protease , Hemolysin .

روش جداسازی ویبریو کلرا به طور خلاصه :



* اگر APW را نتوان پس از ۶ تا ۸ ساعت گرماگذاری به TCBS منتقل کرد، تا ۱۸ ساعت صبر کنید و به‌داخل لولهٔ تازهٔ APW ببرید؛ ۶ تا ۸ ساعت گرماگذاری کنید و سپس به درون TCBS منتقل کنید.

شکل ۶ـ۱. روش جداسازی ویبریوکلرا O۱ و O۱۳۹