

صفحه

عنوان

۱-چکیده

۲-مقدمه

۲-۱- کلیاتی درباره آنتروباکتریاسه ها

۲-۱-۱- تقسیم بندی

۲-۲-۱- اختصاصات عمومی آنتروباکتریاسهها

۲-۲-۱-۱- جداسازی آنتروباکتریاسه ها

جداسازی آنتروباکتریاسه ها

جداسازی از مدفوع

جداسازی از خون

جداسازی از ادرار

کشتهای جداکننده اولیه

۲-۳- تشخیص آنتروباکتریاسه ها

محیط KCN

محیطهای دی کربوکسی لاز

آزمایش متیل رد

آزمایش ایمویک

۲-۴- ساختمان آنتی ژنیک و پیچیدگی آنتی ژنیک

۲-۴-۱- آنتی ژنهای K

۲-۴-۲- آنتی ژنهای H

۲-۴-۳- آنتی ژنهای O

۲-۵- تغییرات و روابط ژنتیکی

۲-۶- شناسایی گروههای فامیل آنتروباکتریاسه ها

۲-۶-۱- جنس سالمونلا

۲-۶-۲- جنس آریزونا

۲-۶-۳- جنس سیتروباکتر

صفحه

عنوان

۲-۶-۴- جنس اشیگلا

۵-۶-۲-جنس اشريشياها

۶-۶-۲-جنس ادواردسيلاها

۷-۶-۲-جنس کلسيلا

۸-۶-۲-جنس انتروباکتر

۹-۶-۲-جنس هافينا

۱۰-۶-۲-جنس سراتياها

۳- شناسایی جنس پروتئوس

۱-۳- عفونتهای پروتئوسی

۱-۱-۳- اپیدمیدلژی و پاتوژنیسته

۲-۱-۳- تظاهرات بالینی

۳-۱-۳- عفونتهای جلدی

۴-۱-۳- عفونتهای گوش و سینوسهای ماستوئید

۵-۱-۳- عفونتهای مجاری ادراری

۶-۱-۳- تشخیص

۸-۱-۳- درمان

۴- هدف

۵- مواد و روشها

۵-۱- کشت بر روی محیط SS

۵-۲- کشت بر روی محیط مکانیکی

۵-۳- کشت بر روی محیط Tsi

۵-۴- کشت بر روی محیط ژلوز ساده

۵-۵- استفاده از تستهای اختصاصی (Api سیستم)

۱-۵-۵- آزمایش اورتونیتروفنیل - بتا- د- گالاکتوزید

۲-۵-۵- آزمایش هیدورژن سولفور

عنوان

۳-۵-۵- آزمایش د آمیناز

۴-۵-۵- آزمایش اوره آز

۵-۵-۵- وژس پروسکائر

۶-۵-۵- آزمایش اندول

۷-۵-۵- آزمایش سیترات

۶-۵-۶- مطالعات باکتریولوژیکی

۶- نتایج

۷- بحث

۸- منابع و مآخذ

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

چکیده

باکتری های این گروه میله ای شکل - گرام منفی - هوازی دارای آنزیم فنیل آلانین و آمیناز هستند. اکثراً دارای زندگی آزاد و غیر پاتوژن بوده و در آب - خاک - فاضلاب و بعضاً جزء فلور طبیعی رود می باشند. پرتئوس مورگانی P. Morgagvill و پرتئوس رنگری در عفونتهای بیمارستانی مشاهده می شود. باکتریهای گروه پروویدا نس اساساً لاکتوز را تخمیر نمی کنند و اگر این کار را انجام دهند بکندی بسیار خواهد بود. پرتئوس ها معمولاً اوره آزتولید می کنند که اوره را تجزیه نموده و ایجاد آمونیاک می نماید. طی عفونتهای اداری توسط پرتئوس ادرار شدیداً قلیایی می شود و تولید سنگهای اداری تسریع می گردد و اسیدی

نمودن آن به سادگی میسر نیست. پروویدا شینسا ایجاد داوره نمی کند

پرتئوس ها به وسیله فلاژلهای پری تریش خود سریعاً متحرکند و معمولاً در سطح محیط های کشت جامد نیز به نحو خاصی جابجا می شوند. جابجا و پخش شدن باکتری در محیط جامد به نام Swarming با هجوم خوانده می شود. برای جلوگیری از این پدیده (که جدا کردن باکتری ها را تقریباً غیر ممکن می نماید). باید به محیط کشت مواد خاصی افزود (مثلاً فنیل اتیل الکل یا محیط هائی مانند CLED که از نظر الکترولیت فقیر هستند باید مورد استفاده قرار گیرد). حرکت سریع باکتری در بخش و هجوم آن بدستگاه اداراری ممکن است سهیم باشد.

پروتئوسها متحرک دارای آنتی ژن H هستد (علاوه بر آنتی ژن O) بعضی از پروتئوسها که به نام OX خوانده می شوند دارای آنتی ژنهای پلی ساکارید مشترکی با ریکتزیا ها می باشند. سرم بیماران مبتلا به ریکتزیور قادر به آگوتینه کردن پروتئوس های OX می باشند.

(که از آن تستی پایه گذاری شده تا به تشخیص ریکتزیز کمک نماید و به نام تست واین وفلیکس Weil – Felix خوانده می شود.) پروتئوسها نیز مانند کلی فرم ها هنگامی که از دستگاه گوارشی خارج گردند ایجاد بیماری می نمایند. باکتری اکثراً در عفونت های ادراری خارج گردند ایجاد بیماری می نمایند. باکتری اکثراً در عفونت های ادراری باکتری می پنمونی و نیز عفونت های کانونی افراد ضعیف و رنجور مشاهده می شود. عفونی شدن از طریق تزریق داخل وریدی نیز مشاهده شده است. از نظر حساسیت نسبت به داروهای مختلف تفاوت بسیاری بین سوشهای پروتئوس وجود دارند.

پنی سیلی اغلب بر روی پروتئوس میرابیلیس *P. Mirabilis* مؤثر است. انواع دیگر پروتئوس در حال حاضر (۱۹۸۲) نسبت به آمینوگلیکوزیدها (آمیکاسین، توبرامایسین و جنتامایسین) سفالوسپرین ها (سفا ماندول و سفولوکسی تین) و کلرامفنیکل حساس می باشند.

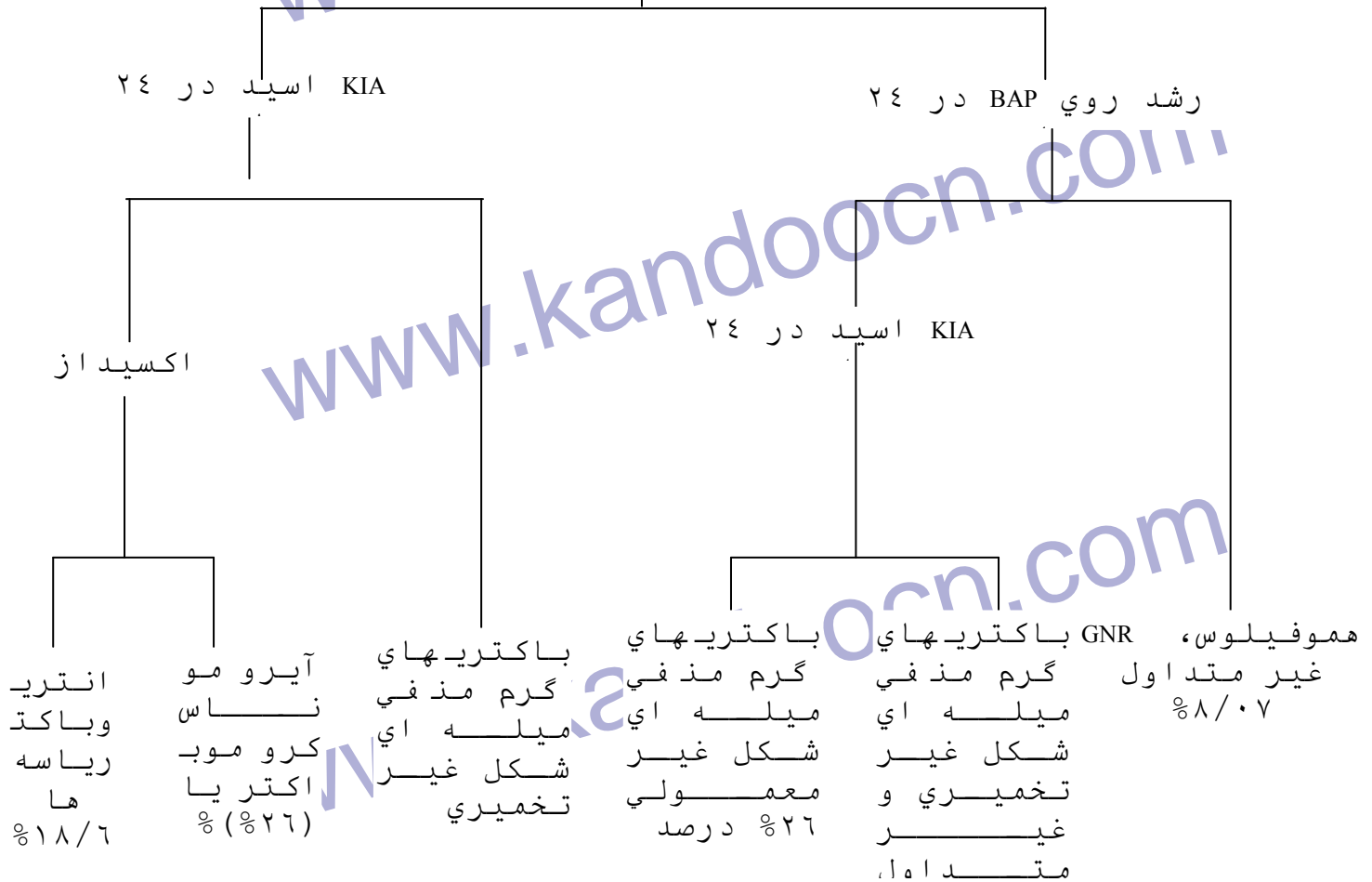
کلیاتی درباره انترباکتریاسه ها *ENTEROBACTERIACEAE*

انترباکتریاسه هافامیل بزرگ از باکتری ها هستند و بیشترین میکروبهای گرم منفی هوازی یا بیهوازی اختیاری می باشند که در نمونه های آلوده بدن انسان یافت می شوند.

یک بررسی جامع که توسط *Pikett و Blachman* در سال ۱۹۸۷ بر روی ۷۶۸ نمونه میکروبهای بدن افراد آلوده انجام گردیده نشان داده است که ۷۸٪ آنها انتروباکتریاسه ها بوده اند. ۱۲٪ از سود و موناسه ها، ۹٪ از هموفیلو سلها و ۱٪ از باسیلهای گرم منفی غیر معمولی مثل اکتینوباسیلوس بروسلا کاردیوباکتریوم، استرپتو باسیلوس.

این بررسی در جدول زیر خلاصه گردیده:

رشد برای محیط مکانیکی
آگار در ۲۴ ساعت



نام انتروباکتریاسه ها بیشتر به خاطر این بر روی باکتریها گذاشته شده است که بیشترین آنها

میکروبهای روده ای هستند، خیلی از این انتروباکتریاسه ها بدون هیچگونه عارضه در روده

انسان وجود دارند و نه اینکه صدمه ای نمی زنند بلکه بعضاً مفید هم هستند. و در تخمیر مواد

غذایی را خل روده کمک می کنند، اشریشیاکولی (E. Coli) یکی از انواع انتروباکتریاسه ها

است که ۹۵ تا ۹۹ درصد میکروبهای ساپروفیت روده را تشکیل می دهند، در یک گرم مدفوع تعدادی برابر 10^{11} عدد از این باکتریها وجود دارند که به صورت بیهوازی اختیاری در روده زندگی می کنند. بیشتر بوی مدفوع مربوط به این باکتری و باکتری های دیگر مثل پروتئوس و میکروبهای گرم مثبت مثل بایفید و باکتریوم (Bifidobacterium) و لاکتوز باسیلهای بیهوازی می باشند.

تقسیم بندی انتروباکتریاسه ها:

CLASSIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE

بعد از دسته بندی که در سال ۱۹۷۴ در هشتمین جلسه

Bergy . S Manufal Of Determiniative , Bacteology.

انجام گردید نظریات گوناگون دیگر بر اساس اختصاصات کشف رد و بیوشیمیایی باکتری ها داده نشد. و تقسیم بندی انتروباکتریاسه ها دچار تغییراتی مختلفی گردید و میکروبیولژیستها معتقدند که دچار سردرگمی گردیده اند خصوصاً که با عرضه شدن تقسیم بندی Edward Center for disease control and Ewing این مسئله شدت پیدا کرد تا این که در سال ۱۹۷۷ و نامگذاری آنها را پذیرفت و امروزه بیشتر دسته بندی انتروباکتریاسه را بر اساس آن انجام میدهند

جدول تقسیم بندی ادوار و اوینگ:

در این نوع تقسیم بندی فامیل انتروباکتریاسه ها به سرگروههای (Speciels) و گروهها

Ginous و انواع Tribe که به دنبال آن گاهی بیوتیپها (Biotypes) نیز قرار می گیرند.

فامیلی: انترو باکترو یاسه ها

سرگروهها: اشیشیاها

جنس ۱: اشیشیا

گونه: اشیشیا کلی

جنس ۲: شیگلا

گونه: (ش) دیسانتری

ش، فلکس نری

ش، پویدی

ش، سونئی

سرگروه ۲: جنس ادواردسیلاها

جنس ۱: ادار سیلاترادا

سرگروه ۳: سالمونلاها

گونه: س، کلرا سیس

س، تیفی

س، انترایتیدس

جنس ۲: آریزونا

گونه: هین شای

جنس ۳: سیتر وباکتر

گونه: س، فروند دای

س، دایورسوس

سرگروه ۴: کلیسیلاها

جنس ۱: کلیسیلا

گونه: ک، پنومونیه

ک، اکسی توکا

ک، اوزابا

ک، رینوسلکراماتیس

جنس ۲: انتروباکتر

گونه: ۱ کلواکا

۱، جرگوبیا

۱، آگلومرانز

۱، آئروچینوزا

۱، ساکازاکایا

جنس ۳: هافینا

گونه: ه، آلوئی

جنس ۴: سراتیاها

گونه: سراتیا مارسه سنس

گونه: م، مورگانلا

سرگروه ۶: یرسیناها

جنس ۱، یرسیا

گونه: ی، یرسینا پستیس

ی، انتروکوکیتیکا

ی، سود و توبرکولوزیس

ی، فردریک سنپای

ی، کریستانسیای

ی، روکری

سرگروه ۷: اروینها

جنس ۱: اروینیا

جنس ۲: پکتوبا کتریوم

جنس کلوی ورا *Kluy vera* در سال ۱۹۸۱ توسط Farmer و دستیا را نش جز انترباکتریها

سه ها قلمداد گردیده است که قبلاً به نام میکروبهای دوره ای گروه ۸ (Enteric group)

نامیده می شده است، این جنیوس بیشترین اختصاصات شیمیایی انتروباکتریاسه ها را دارا می

باشند، سه نوع از این جنیوس نامبرده شده که عبارتند از:

کلوی وار - آسکوراتا (*k. ascabata*) کلوی ورا کرایو کرسنس (*K. cryocrescents*)

کلوی وار - گ - گروه ۳ (Species-group)

نوع آسکاراتا از کرا یو کرسنس با + بودن آزمایش آسکورات عدم رشد، در ۵ درجه سانتی

گراد در یخچال وزون کوچکتر در اطراف دیسک کار پنی سیلین و سفالوتین فرق گذاشته می

شود.

نویسنده مقاله (Farmer) معتقد است که این باکتری جز با توژنهای فرصت طلب هستند و جنیوس دیگر اخیراً به آنتروباکتربا یا سه ها اضافه گردیده یکجا تا توملا تاپسئوس طیف وسیع در اطراف دیسک پینی سیلین و رغبت بودن داخل بعضی محیطها بعد از ۷ روز و تعداد کم فلاژله در اطراف باکتری فرق دارد.

این باکتری به آمینی سیلین - سفالوتین - تترا سکین - کلر آمفنیکل - آمینو گلو سیدها حساس هستند. دیگری سداسیا Cedacea (نام از DCD) که از نمونه های مختلف بدن انسان جدا شده. ولی اختصاصات آنها ذکر نگردیده است. انواع آنها، C.davisae و C.lapagel ذکر شده اند.

اختصاصات عمومی فامیل آنتروباکتریاسه:

اعضای خانواده آنتروباکتریاسه ها گرم منفی و باسیلی شکل و مستقیم هستند که بیشتر آنها متحرک می باشند گرچه بعضی جنسها مثل کلسیلا و شیگلا غیر متحرک هستند) آنها پریتریکوس فلاژلاژ می باشند، (سود و موناسه ها که پولا ر فلاژلا هستند). و چندین سویه مثل سالمونلاها شیگلاها آنتر و باکترپروتئوس دارای فیمبر یا پاپیلی هستند که عامل متحرک باکتری نبوده و هیچگونه خاصیت آنتی ژنتیک- باکتریهانی دهند و فقط در زیر میکروسکپ الکتروسی دیده می شوند.

تمام آنتروباکتریاسه ها گلوگز را در شرایط هوازی و بیهوازی تخمیر می کنند بعضی با گاز و بعضی بدون گاز (این یکی از اختصاصات خانواده آنتروباکتریاسه هاست)، نترات را به نیتريت احیاء می کنند و تولید اندوفنل اکسیداز نمی کنند (اکسیداز منفی هستند).

انتروباکتریاسه ها شامل گروههای کوچک و بزرگ هستند که دارای ساختمان آنتی ژنتیک و خواص شیمیایی مختلف هستند بر اساس همین اختصاصات شیمیایی دسته بندی شده اند بعضی از نامها که بر روی آنها گذاشته شده اند از منطقه جغرافیایی گرفته شده که باکتری اول با در آنجا یافت شد و بعضی دیگر به نام افرادی که اولین بار آنها را کشف کرده اند، ساختمان آنتی ژنتیک انتروباکتریاسه ها زمانی خوب شناخته شده که White و Kauffmann بررسیهای وسیع خود را بر روی سالمونلاها انجام دادند و سروتیپها و بیوتیپهای آنها را مشخص نمودند که تستهای سرولوژی قابل بررسی است.

باکتری ها در مورد انسان و حیوانات یافت می گردند و در خاک و روی گیاهان نیز وجود دارند، خیلی از آنها پارازیت هستند و بعضی دیگر ساپروفیت هستند، خیلی از انواع آنها برای انسان بیماریزا هستند و ناراحتیهای انتریک یا سپتی سمی و یا دیگر عوارض عفونی ایجاد می کنند.

از لحاظ شرایط کشت این باکتریها معمولاً بر روی محیط ژلوز خوندار کلینهای مشابه تقریباً درشت، براق و خاکستری، خیس که ممکن است همراه با همولیز یا بدون همولیز باشند تولید می کنند و آندسته از انتروباکتریاسه ها که تولید گاز هیدورژن سولفور (SH₂) می کنند یک هاله سبز رنگ در قسمت زیر پلیت ایجاد می نمایند. بر روی محیط تریپتوکس سوی آگار نوترین آگار و میت اینفوژن آگار ایجاد کلینهایی می نمایند که ممکن است در اندازه فرق داشته باشند ولی عموماً سفید متمایل به خاکستری شفاف و کمی برجسته هستند بعضی از آنها موکوئید هستند مثل کلبسیلاها، برخی از سویه های شیگلاها و بعضی از سالمونلاها تغییر یافته خصوصاً سالمونلا انتریتیدس سروتیپ تیفی مورنیدم.

S. enteritidis's sorotype, typhoerium

تغییرات کلنی مشاهده گردیده.

و گاهی تبدیل کلینهای S به R و R به S انجام پذیرفته است.

جداسازی انتروباکتریا سه ها **Isolation of Entrpbacter**: برای بدست آوردن بهترین

نتیجه و بهترین جواب برای کشت میکروبهای روده ای باید از محیطهای کشتی استفاده نمود

که بتوان مشخصات باکتری های مختلف را از آنها تشخیص داد. و به علت اینکه ممکن است

این باکتریها از منابع مختلف آلودگی بدن جدا گردند بهتر است جداکردن آنها را از مدفوع -

خون و ادرار و دیگر مایعات بدن مورد بررسی قرار داد، در آزمایشگاه باید توجه داشته باشیم

که نمونه های ممکن است حاوی مقدار کمی باکتری باشند، پس از انتخاب محیط و مقدار

نمونه کشت شده بر روی آنها از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. مثلاً استفاده از

محیطهای اختصاصی یا انتخابی سالمونلا و شیگلا برای رشد میکروبهای دیگر مثل پروتئوس

واشیشیا مناسب نیست و باید همه جوانب را در نظر گرفت.

جداسازی از مدفوع Isolation frpm stool:

هنگامی که امکان عفونتهای روده ای می باشند. نمونه تازه مدفوع باید تهیه گردد (بعضی

پیشنهاد چند نمونه را داده اند) البته رکتال سو آب بی فایده نیست ، ممکن است تعداد

باکتریهای پاتوژن در بین زمان نمونه برداری و کشت کم شود که در این صورت باید از

محیطهای نگهدار کننده استفاده نمود و بهترین محیط **sturat medium** می باشد.

Ewing و همکارانش گزارش نتیجه عالی از کشت مدفوع از کشت مدفوع بعد از یک

هفته را با استفاده از محیط استوارت داده اند.

بعلت اینکه مدفوع دارای انواع میکروبیهای فلور طبیعی می باشد باید یک یا چند محیط از انواع محیطهای غنی کننده زیر را مورد استفاده قرار داده عبارتند از:

(Muller)Tranionate و یا (Lieffsen seinente broth, (Hajna) Gn broth

broth تترا تیونات اصلاح شده توسط kuffman که حاوی صفرا و سبز برلیان می باشد رشد

خیلی عالی به سالمونلا می دهد اما از رشد شیگلاها معمولاً جلوگیری می نماید ولی تترا

تیونات همراه با املاح صفراوی محیط غنی کننده خوبی است. طرز استفاده از محیط آبگوشتی

مایع بدین ترتیب است که مقدار نمونه اضافه شده به آنها باید حداقل یکدهم حجم کل محیط

باشد اگر مدفوع دارای موکوس باشد حتماً از آن قسمت مدفوع برای کشت استفاده نمود. بعد

از ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار دادن در ۳۵ درجه از محیط غنی کننده برداشت نموده و بر روی

محیطهای دیگر که به عنوان محیطهای افتراقی و انتخابی مصرف می شوند، کشت می گردد و

همه محیطی با هم در اتو قرار می گیرد، چنانچه پلیت ها بعد از ۲۴ ساعت رشد نداشتند

مجدداً از محیط غنی کننده که اکنون ۴۸ ساعت در اتو بوده است، بر روی پلیت ها کشت می

کنیم. محیط های افتراقی که ممکن است بکار رفته شوند عبارتند از:

EMB , McConkey و دوزوکسی کولات آگار Dezoixeholate agar محیطهای

انتخابی عبارتند از XLD (Xylese lysine Dezoxycholate) و (Dezoxtholate-

. citrate agar) D.CA

محیطهای دیگری همچون KBGA (Kuffman Brilliant green , agar) و (wilson

WBSA) Blair bismouth sulfite agatr – که محیط ه ای پیچیده ای از لحاظ مواد

غذایی هستند پیشنهاد گردیده است که از رشد باکتری فلور طبیعی مثل اشریشیاها و پروتئوسها بخوبی جلوگیری نمود و رشد خوبی به تمام سالومونلاها و بیشتر شیگلاها می دهد.

از محیطهائی که در فوق به آنها اشاره شد محیط SS اجازه رشد به تمام شیگلاها نمی دهد و امروزه کمتر مورد استفاده قرار می گیرد ولی اگر ناچار به استفاده از آن باشیم بهتر است در کنار آن از محیط دیگری همچون McConkey استفاده نماییم که میکروبهای تخمیر کننده لاکتوز را (شیلا) خوب نشان می دهد و HEA XLD از بهترین محیطهای انتخابی هستند که امروز به مقدار وسیع در آزمایشگاهها مورد استفاده قرار می گیرند.

از میان محیطهای افتراقی که مورد استفاده قرار می گیرند محیطهای FBM و

McConkey به دو صورت مصرف می شود. یکی به طریق مستقیم (Direct) (صورت یک

محیط غنی کننده جامد مصرف می گردد. دیگری غیر مستقیم (indirect) که به عنوان محیط

ثانوی بعد از محیط غنی کننده مصرف می گردد، اما جمع بین این دو کسر همیشه همراه محیط

غنی کننده نظر بهتر می رسد که همیشه همراه محیط غنی کننده GN broth یا Scientite

یک محیط FBM یا مکانیکی از مدفوع مستقیماً کشت نمایم تا چنانچه میکروب پاتوزونی بر

روی آنها رشد کرده زودتر به نتیجه برسیم، چنانچه جدا کردن اشریشیا کلی - کلیسلا و انترو

باکترویا ستیرو باکتر و عفونتهای روده ای اسهالی همراه با توکسین , Enterotoxigenic

Entro invasive and Entro Pathogenic

مورد نظر باشد. استفاده کردن از محیطهای غنی کننده ذکر شده فوق نتیجه نمی دهد، حداکثر

آن محیطها رشد باکتریهای فوق را حذف می کنند و بهترین کار کشت کردن مستقیم روی

FBM و یا McConkey می باشند.

چون تخمیر لاکتوز یکی از مقدمات جداسازی انتروباکتريا سه ها می باشند اکثر محیطهای معرفی دارای قند لاکتوز و اندیکاتورهای مناسب می باشند تا به صورتی در جداسازی آنها کمک نماید. باکتریهای لاکتوز منفی (به آندسته که لاکتوز را تخمیر نمی کنند اصطلاحاً لاکتوز منفی می گوئیم و برعکس) مثل سالمونلاها و شیگلاها و پروتوسیس ایجاد کلینهای ریز و بیرنگ بر سطح پلیتهای دزوکسی کولات ستراتات EBM, McConkey, XLD, SS می نمایند و بر روی محیط HE, Agar سالمونلا و شیگلا و اشتباه گردد خصوصاً محیطهای EBM و McConkey که مقدار ۰.۵٪ آگار داشته باشند. کلنی باکتریهای لاکتوز مثبت بر روی دزوکسی کولات ستراتات (اگر حذف نگردند) SS, McConkey قرمز دیده می شوند.

بر روی EBM بنفش تیره تا سیاه رنگ که اغلب جلای فلزی دارند و بر روی HE - agar قرمز متمایل به نارنجی تا نارنجی مشاهده می شود.

بر روی محیط بیسموت سولفیت آگار، (B. SA, Bisuth sulfite agar) سالمونلا تیفی (S. Typhi) ایجاد کلنهای سیاه یا جلای فلزی مینماید، متخصصین، پیشنهاد می کنند برای استفاده از این محیط برای کشت پریلیت (pour plate) می باشند.

جداسازی از خون (Isolation from Dis.):

از افراد مبتلا به بیماری تب آور (Febrile Dis) که عامل بیماریهای آنها مشخص نیست. غالباً کشت خون تهیه می گردد که در فصل نمونه برداریها چگونگی انجام آنرا با روش عمومی ذکر کردیم ولی اگر کشت خوب برای سالمونلا و شیگلا خواسته شود (شیگلاها بندرت در کشت خون یافت می شوند) حدود ده میلی لیتر خون گرفته شده را به ۹۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر محیط (Bile broth) اضافه نمود و در ۳۵ درجه قرار می دهیم.

اگر جواب کشت بعد از ۲۴ ساعت منفی بود آنرا برای ۱۰ تا ۱۴ روز قبل از اینکه پاسخ منفی دهیم در اتو نگهداری می کنیم.

در بیماریهای تیفوئید (Typhoid Fever) معمولاً کشت خون در هفته اول یا دوم شروع

بیماری گرفته می شود، در سبب سمی و ناشی از دیگر سالمونلاها غیر از سالمونلاتیفی کشت خون باید در هفته اول گرفته شده و اگر منفی بود در هفته دوم تکرار گردد.

کشت مغز استخوان نیز در بیماری سالمونلازیس نتیجه خوبی می دهد، (یادآوری می گردد

که عموماً کشت خون قبل از کشت مدفوع (+) می شود. در طی هفته اول بیماری کشت خون

در ۹۰٪ موارد مثبت می گردد. در حالیکه کشت مدفوع فقط حدود ۱۰٪ موارد در هفته اول

(+) می شود.

کشت مجدد (sub cultures) از محیط Bile broth یا هر محیط دیگری که به عنوان

محیط کشت خون مصرف شده به محیطهای دیگر همانند روشی است که در کشت مدفوع

ذکر گردید، یعنی استفاده از محیطهای مثل BSA و EBM.

McConkey خیلی از محققین معتقدند که انتقال میکروب از کشت اولیه محیط

McConkey و یا EBM جهت شناخت نوع کلنی به نظر می رسد و می توان به بقیه راه را

برای شناسائی نهائی ادامه داد.

جداسازی از ادرار:

سالمونلاتیفی در ۲۵ درصد موارد ممکن است از ادرار جدا گردد، دیگر انتروباکتری یاسه ها

نیز ممکن است از این منبع جدا گردند که می توان دیگر سالمونلاها، اشر شیاها، کلبسیلاها و

پروتئوسها را نام برد. برای کشت ادرار پیشنهاد می گردد که از محیطهای افتراقی و انتخابی بروش مستقیم (direct) کشت گردد.

بهترین نتیجه از کشت ادرار برای یافتن سالمونلا استفاده از رسوب سانتریفوژ شده ادرار با دور ۲۵۰۰ یا ۳۰۰۰ در دقیقه می باشد که چند لوپ از رسوب را در محیطهای لازم به طریق استریک گالچر کشت می نماییم و بقیه رسوب را در محیط کشت غنی کننده مثل سلینت- برات یا بایل برات روش خوبی است.

کشتهای جدا کننده اولیه (Proliminary Scrinng cult - ures) کلنی ها سالمونلا و شیگلاها و اختصاصات آنها همانگونه که قبلاً در این فصل به آنها اشاره شد بر روی محیط های آزمایشگاهی مشخصاً لاکتوز منفی هستند که باید کلنی های مشکوک را از اینگونه محیطهای کشت به یک سوی محیطهای دیگر منتقل کرد تا با بررسی بیشتر باکتری مشکوک شناخته شود، این عمل انتقال با لوپ سوزنی از یک کلنی منتقل می گردد و چنانچه مقدور باشد باید از هر پلیت دو تا سه کلنی مستقل را منتقل می گردد و چنانچه مقدور باشد باید از هر پلیت دو تا سه کلنی مستقل را منتقل نماییم. (باید توجه داشت بعلت احتمال وجود کلنی های ریزی که قبل رؤیت نیستند هیچگاه هنگام انتقال باکتری به محیطهای افتراقی و تشخیص لوپ را در سطح پلیت سرد ننمائیم).

روش اینکار اینگونه است که با لوپ سوزنی ابتدا در ته لوله TST آگار (Trip;e sugar Iron Agar) یا KIA (Kligler's Iron agar) فرو کرده و بعد به طور زیگزاگ در سطح لوله (Slant) کشت می نمائیم. لوله باید با پنبه درپوش بسته به نحوی که هوا بتواند داخل و خارج گردد و هرگز لوله کاملاً بسته نمی شود که باعث غلط شدن تشخیص گردد.

محیط TSI آگار دارای سه نوع قند گلوکز، لاکتوز و ساکارز به همراه مصرف فنل رد و سولفورو آهن می باشد که جمعاً تخمیر قند و تولید H_2S در (سیاه شدن ته لوله) در محیط را نشان می دهند، مقدراً گلوکز یک دهم مقدار لاکتوز و سوکروز است و محیط KIA دقیقاً همانند TST آگار می باشند به جز اینکه قند سوکروز را ندارد مقدار کم گلوکز در قسمت سطح لوله باعث می شود که پس از تخمیر و ایجاد مقدار کم اسید خیلی زود اکسیده گشته و بحالت قلیایی بر می گردد و برعکس این عمل تخمیر در عمق لوله ثابت می باشد زیرا مقدار اکسیژن کمتر از سطح لوله است.

بهترین نتیجه گیری از محیط TST آگار را می توان ۱۸ تا ۲۴ ساعت بعد از اینکوباسیون در ۳۵ درجه تا ۳۷ درجه دریافت نمود و هیچگونه ارزشی بعد از ۴۸ ساعت ندارد نتیجه گیری از محیط TST می توان کرد چنین است.

- ۱- ته محیط اسیدی (زرد) و سطح لوله قلیائی (قرمز) - قند گلوکز تخمیر شده است.
- ۲- تمام محیط اسیدی (زرد) - لاکتوز یا سوکروز یا هر دو تخمیر شده اند.
- ۳- حبابهای گاز در ته لوله و محیط قسمت شده - تولید گاز و هنگام تخمیر قند و گلوکز.
- ۴- سیاهی در ته لوله - تولید گاز
- ۵- تمام لوله قلیائی (قرمز) - هیچکدام از سه قند تخمیر نگردیده است و تشخیص انتروباکتریاسه ها.

به علت شباهت انواع پروتئوسها با سالمونلاها و شباهت بعضی باکتریهای دیگر باشیگلاها و غیره شکل محیط TST آگار لازم است در کنار این محیط محیطهای دیگر نیز مورد استفاده قرار گیرد تا تشخیص را ساده تر نماید، این محیط ها عبارتند از:

(Rusting in and stuart uree broth, Christencen urea agar)

که کشت باکتری بر روی هر دو آنها در صورت تولید گاز آمونیاک، باعث تغییر رنگ از زرد به قرمز می شود جمع بین دو محیط TST آگار و محیط اوره تا حدودی می تواند ما را به

شناسائی باکتری کمک نماید.

محیط دیگری که به همراه TST مورد استفاده قرار می گیرد LIA می باشد که در جدول صفحه بعد مقایسه دو محیط دیده می شود.

ارگانیسم	<i>Slant</i>	<i>Butt</i>	<i>Gas</i>	<i>SH₂</i>	<i>Slant</i>	<i>Hutt</i>	<i>SH₂</i>
آریزونا سیتروباکتر	A یا K	A	+	+	K	K	+یا-
فروند دای	A یا K	A	+	+	K	A	+یا-
داریورسوس	A یا K	A	+	-	K	A	-
آمالوناتیکوس	A یا K	A	+	-	K	A	-
اشرشیاکوی	A	A	+ یا -	-	K	A یا K	-
	K	A	-	-	K	A یا K	-
	K	A	-	-	K	K	-
	K	A	+	-	K	A یا K	
ادوار سیلاها	K	A	-	+	K	K	+
کلواکا	A یا K	A	+	-	K	A	-
آئورجینوس	A	A	+	-	K	K	-
آگلویرامز	A یا K	A	+ یا -	-	K	K	-
ساکازاکی	A	A	+	-	K	A	-
انتروباکتر							
ارگانیسم	<i>Slant</i>	<i>Butt</i>	<i>Gas</i>	<i>SH₂</i>	<i>Slant</i>	<i>Hutt</i>	<i>SH₂</i>

جروگویا	A یا K	A	+	-	K	K	-
هافینا	K	A	+	-	K	K	-
کلبسیلا	A یا K	A	+	-	K	A یا K	-
پروتئوس							
ولگاریس	A یا K	A	+	+	R	A	-
میرابلیس	K	A	+	+	R	A	-
پروویدنسیاها							
آلكالی فی سنس	K	A	- یا +	-	R	A	-
استوارتیای	K	A	- یا +	-	R	A	
مورگانلا مرگانی	K	A	+	-	R یا K	A	-
سالمونلا- تیفی			-	- یا +			- یا +
باکتریهای دیگر	K	A	+	+	K	K	- یا +
سراتیا	K	A	- یا +	-	K	A یا K	-
شیگلا	K	A	-	-	K	A	-
یرسینا	K	A	-	-	K	A	-

محیطهای نیمه جامد:

مثل Motility – Indole lysine با MIL و یا SIM مورد استفاده قرار می گیرند تا حرکت باکتری و تولید اندول را مشخص نماید در این محیطها باکتری بالوپ سوزنی به طور عمودی در عمق کشت داده می شود در صورت متحرک بودن باکتری بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت محیط ساعت محیط کدر می گردد (باکتری در تمام لوله پخش می گردد) و چنانچه غیر متحرک باشد کدورت فقط در مسیر کشت دیده می شود.

محیط KCN-

یک محیط مایع و دارای سیانور پتاسیم می باشد که بعضی باکتریها مانند کلبسیلاها و سینتروباکترها آنرا تحمل کرده و در محیط رشد می کنند ولی بعضی دیگر مثل سالمونلاها در آن رشد نمی کنند و راهی برای نشاسازی این دسته از باکتری هاست.

محیطهای دی کربوکسی لاز (Decarboxylase).

کشت محیطهای انتروباکتریاسه ها به طور جداگانه مجزا و مستقل بر روی این محیطها که حاوی اسید آمینه های لایزین (L- lysine) آرژنین (L- arginine) و ارنیتین به مقدار یک درصد می باشد پس از یک یا دور روز مثبت می شوند بعلت قلیایی شدن محیط از زرد (تخمیر اولیه قند گلوکز) به رنگ بنفش (به علت دی کربوکسیله شدن اسید آمینه موجود) تبدیل می گردند، چنانچه بعد از چهار روز محیط اداری رنگ زرد بشود، جواب منفی است، یعنی باکتری آنزیم دی کربوکسی لاز یا دی هیدرولاز را نداشته است.

اثر آنتروباکتریاسه ها بر روی محیط ها در جداول عمومی آنتروباکتریاسه ها نشان داده شده است.

آزمایش متیل رد (Methyred test):

اضافه کردن ۵ قطره محلول متیل رد به ۵ میلی لیتر از محیط کشت ۴۸ ساعته (RVP) Clarck and tubs dextrosebreth باعث ایجاد رنگ قرمز ثابت می نماید این آزمایش در صورتی مثبت است که PH محیط کشت، باعث ایجاد اسیدیته خیلی زیاد از تخمیر قند دکستروز کمتر از ۴/۵ باشد، در غیر این صورت رنگ زرد یا نارنجی ایجاد می گردد.

برای تهیه محلول متیل رد ۰/۱ گرم پودر متیل رد را در ۳۰۰ میلی لیتر الکل ۹۵٪ حب نموده و سپس محلول را با آب مقطر به ۵۰۰ میلی لیتر می رسانیم آزمایش ایمویک (IMVIC test):

آزمایش ایمویک جمع آزمایشهای است که در فوق بررسی گردید I علامت اندول M علامت متیل رد (Methl red) V علامت وژس پروسکائر Voges Proskaur و C علامت سیترا Citrate می باشد و به صورت علامت بعلاوه و منها نشان داده می شوند مثلاً گفته می شود که آزمایش ایمویک E. Coli -- (از چپ به راست) می باشد و کلیسلا ++- و این نشان دهنده مثبت یا منفی بودن آزمایشهای فوق است.

ساختمان آنتی ژنیک و پیچیدگی آنتی ژنیک: (Antognic complexity)

گرچه اکثر انتروباکتریاسه ها را می توان با تخمیر قندها و دیگر آزمایشهای متابولیک شناسائی نمود ولی به علت شباهت خیلی از آنها در اینگونه بررسی ها شناسائی نهایی بر پایه ساختمان آنتی ژنیک استوار است.

اعضای خانواده انتروباکتریاسه ها دارای موزائیک آنتی ژنی هستند که عمده ترین آنها سه دسته هستند که عبارتند از:

الف: آنتی ژنهای K (از کلمه آلمانی Kapsel) یا آنتی ژنهای کپسولی (Envelop ags) به آن دسته از آنتی ژنها اطلاق می شود که سلول باکتری را احاطه نموده و بجز نمونه های استثنائی که به حرارت حساس هستند و بین ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در حرارت جوش از بدن می روند جنس این آنتی ژنها بیشتر از پلی ساکارید است و در بعضی از باکتریها مثل سالمونلا آنتی ژن نامیده می شود زیرا به نظر می رسد که در بیماریزائی باکتری دخالت دارند ولی دلیل این ارتباط هنوز به طور مشخص معلوم نگردیده است.

آنتی ژنهای کپسولی بهنگام آلگوتیناسیون با آنتی سرمهای اختصاصی ایجاد مزاحمت می کند (به علت پوشاندن آنتی ژن سوماتیک) و باید با حرارت از بین برده شوند. این وضعیت در بعضی باکتریها که آنتی ژنهای کپسولی خیلی نازک میباشد وجود ندارد، و بعضی دیگر که آنتی ژنهای کپسولیشان خیلی کلفت و ضخیم است مثل کلبسیلا بدون کشتن باکتری و از بین بردن آنتی ژنهای کپسولی هرگز آلگوتینا سیون با آنتی سرم سوماتیک امکان پذیر نیست.

ب- آنتی ژنهای H از کلمه آلمانی (Hauch) یعنی پخش شوند (Spreading) یا آنتی ژنهای فلاژله (Flageller antigens) در فلاژه قرار گرفته و جنس آنها از پروتئین بوده که به

حرارت حساس می‌باشند و در حرارت آب جوش به مدت یک تا دو ساعت از بین می‌روند
آنتی ژنهای فلاژله دارای دو فاز مختلف هستند. یکی فاز یک Phase ۱ flagellar Ags و
فاز دو Phase ۲ flagellar Ags که فاز دو کمتر اختصاصی هستند و در خیلی باکتریها
مشابه هستند.

ح- آنتی ژنهای O: از کلمه آلمانی (Ohne Hauch) یعنی پخش نشونده Non spreading
یا آنتی ژنهای سوماتیک (somatic antigens) که به حرارت مقاوم بوده و در سل وال
باکتری قرار دارد و از لحاظ ترکیب شیمیایی جنس آنها پلی ساکارید است.
این آنتی ژنها ممکن است به گروهها و زیرگروههای مختلف تقسیم شوند که مثلاً در
سالمونلاها گروهها و زیرگروههای زیادی هستند که مهمترین گروهها گروههای A و CB و
D و E می‌باشند.

بررسی هائی که توسط Pauffmann و White بر روی ساختمان آنتی ژنیک
آنتروباکتریاسهها و خصوصاً سالمونلاها انجام داده اند دسته بندی و گروه بندی آنتی ژنها
دقیقاً مشخص گردیده است.

در اینجا نمای شماتیک آنتی ژنهای OH و Vi در انتروباکتریاسهها دیده می‌شود.

www.kandooocn.com
www.kandooocn.com
www.kandooocn.com
www.kandooocn.com

بغیر از آنتی ژنهای فوق انتروباکتریاسه ها دارای آنتی ژنهای فرعی دیگری هستند که از جمله می توان Kunin antigen را نام برد، که در پرسینیاها و وجود دارد. این آنتی ژن با آنتی بادی اختصاصی به علت ساختمان ظاهری قابل رسوب دادن نمی باشند و فقط بروش هم آگلو تیناسیون Hem - agglutination test قابل رسوب دادن است و گلبول قرمز به کمک آنتی ژن آمده و سپس با آنتی بادی رسوب می کنند.

تغییرات و روابط ژنتیکی: Genetic ariation and genetic relations محیط روده یک محل مناسب برای رشد و تغییرات باکتریهای روده ای است و تعداد باکتری ها خیلی زیاد بوده و همچنان محیط کشت مناسب باعث رشد و تکثیر آنها می گردد بالطبع تغییراتی ممکن است در سویه ای ایجاد شود و ژنهایی از یک سوبه سوی دیگر منتقل گردد یا به وسیله انتقال پلاسמידها و ژنهای باکتری در conjugation عمل تغییر ژنتیک انجام گیرد.

www.kandooocn.com
www.kandooocn.com

به طور مثال باکتریهای سالمونلای لاکتوز منفی ۱ روزه بصورت لاکتوز مثبت نیز دیده نشده اند که از بیمارارن مبتلا به اسهال اپیدمیک در بززیل جدا گشته است. پلاسمدهایی که

خصوصاً در باکتریولژی اهمیت دارد و مهم هستند در انتروباکتری یاسه ها به نام فاکتورهای R (R factor) نامیده که ژنهای فراوانی برای مقاومت باکتری ها را حمل می کنند، این پلاسمیدها در شیگلاها و در ژاپن کشف شده اند که امروزه در سالمونلاها و کلی فرمها نیز به طور وسیعی شناخته نشده اند. مثلاً فاکتوری از فاکتورهای R در E. Coli منتقل شده و به E. Coli پاتوژن تبدیل گردیده و شخص می تواند به صورت یک منبع آلودگی اپیدمیک درآید ولی مسلماً این تغییرات و این جابجائی فاکتورها در سالمونلاها و شیگلاها از اهمیت برخوردار هستند.

تغییرات دیگر ژنتیکی که ممکن است دیده نشود این است که سویه هائی از انتروباکتریاسه ها که دارای فلاژله هستند طی موتاسیون ژنتیکی فلاژله خود را از دست داده و به صورت باکتری غیر متحرک درآید. شناسایی گروههای فامیل انتروباکتریاسه ها:

۱- جنس سالمونلاها (Genus Salmonella)

بیماری زا- تب روده یا تب تیفوئید. سپتی سمی که همواره با تب شدید و عفونت خونی انترولوکیت که قبلاً کاستروآنتریت نامیده می شد دروه کمون ۲ تا ۷ روز همراه با اسهال، دل درد، بی حالی، استفراغ و به دنبال آن تب می باشد.

درمان توسط کلرا مفیکل، آمپی سیلین تری متوپریم سولفا متاکسا زول می باشد.

۲- جنس آریزونا Arizona:

در عفونتهای انسانی دیده شده اند ولی بیشتر سروتیپ های آنها در مرغ و سگ و گربه ایجاد بیماری می نمایند.

۳-جنس سیتروباکتر:

عموماً غیر بیماری زا بوده و جز باکتریهای آپورجونیت محسوب می گردد ولی به هر حال از آنها عفونتهای دستگاه ادراری و باکترمیایا دیده شده است.

در مقاله گراهام و بند (Band & Phigeila):

شیگلا در مقایسه با سالمونلاها کمتر باعث بیماریزائی می گردند، این باکتری با حمله به بافت موکوس اپی تلیال ایجاد تورم و نیز زخم می کند. این حملات ادامه می یابد و امکان ورود به دیگر بافتهای بدن از ناحیه زخم می باشد که گاهی به ندرت سپتی سمی ایجاد می کند.

از میان ۵۶۹ کودک آفریقای جنوبی که به شیگلوزیس مبتلا شده اند فقط ۱۱ نفر سپتی

سمی گرفته اند. درمان توسط آمپی سیلین - کوتریموکسازول و تتراسیکلین می باشد.

۵-جنس اشرشیاها:

اشرشیا را قبلاً کلی فرم می نامیدند ولی امروزه کلی فرم اشرشیاها، کلیسیلاها، انتروباکتر و

سراتیاها می گویند، از انواع معروف آن می باشد.

بیماری زائی:

- بیماریهای خارج دستگاه روده ایست که مهمترین آن عفونت دستگاه ادراری است و تا

۷۵٪ عفونتهای ادراری را شامل می گردد که یکی از عوامل مهم نفريت می باشد.

همراه با ادرار چرک و خون دیده می شود. و بیماری با ورم و فشار خون همراه است و گاهی

سیستیت (Cystitis) عفونت مثانه می دهد. سپتی سمی هم می دهد و تولید شوک می کند.

عفونت های سطحی پوست می دهد خصوصاً بعد از جراحی تو عفونت دستگاه تنفسی را

ایجاد می نماید.

- عفونتهای داخلی روده ای: عفونت اسهالی نوزادان (Neonatal - dia) که در افراد زیر

دو سال با صداهای شکم، دل درد، اسهال و استفراغ همراه است.

اسهال مسافرتی (Travelar diarrbea) عفونت روده ای که بزرگسالان مبتلا می گردند.

درمان مؤثر توسط سولفانامیدها، آمینوگلیکوسیدها، کلرامفیکر، آمپی سیلین، کارپنی سیلین،

سفالوتین و کانامایسین صورت می گردد.

۶- جنس ادوارد سیلا، Genus Edwardsiella:

بیماری زائی - اسهال عفونی، عفونت و زخمهای بعد از عمل جراحی.

۷- جنس کلبسیلا:

الف- یکی از عوامل مهم عفونت دستگاه ریوی است، عوارض، تب، سوز، دردهای قفسه

سینه، سرفه های سخت با خلط چرکین و غلیظ در افراد مسن دیده می شود.

ب- عفونتهای دستگاه ادراری.

ج- عفونتهای مجاری صفراوی.

د- عفونت حفره صفافی بدن.

ه- عفونت گوش میانی، ماستوئید و مننژیت.

۸- جنس انتروباکتر:

۹- جنس ها فیئا:

الف- عامل بیماری مننژیت نوزادان.

ب- عفونت دستگاه ادراری.

۱۰- جنس سراتیاه:

بیشتر آن عفونتهای بدن جدا گردیده در عفونتهای بینی بالای دستگاه تنفسی و دستگاه

ادراری دیده شده است. اگرچه بعضی انواع دیگر از منابع انسانی از جمله خلط جدا شده اند.

درمان توسط اکثر آنتی بیوتیکها، میسر است، فقط به سفالوسپورینها و پلی میکسین ها مقاومت

نشان می دهند.

رشد کلنی پروتئوس بر روی محیط آگار خوندار که توسط یک لایه نازک آگار پوشانده شده

است.

شناسائی جنس پروتئوسها:

در تقسیم بندی Edward & Eving جنسهای پروتئوس و پروویدنسیا و مورگانلا را به نام Tribke Proteus نامگذاری نموده اند، که خیلی از اختصاصات کلی آنها به یکدیگر شباهت دارند.

پروتئوسها در خاک- آب- فاضلاب و مدفوع انسان یافت می گردند و باسیلها گرم منفی و متحرک می باشند. آنها معمولاً لاکتوز منفی و اوره از مثبت هستند، تحرک آنها بیشتر در ۲۵ درجه بوده و در ۳۵ درجه کمتر است. انواع آنها عبارتند از پروتئوس میرابلیس و ولگاریس Wulgaris و Mirablis که بر روی محیطهای ژلوز خون دار ایجاد سوآرمینگ Sworming کرده و تولید زمینه خاکستری مایل به آبی می نمایند، حالت خزندگی (سوآرمینگ) بر روی محیطهای MacConkey. EBM را با بالا بردن درصد آگار محیط ۵٪ می توان متوقف کرد.

کلنیها پروتئوسها از فرم و شفاف تا کدر دیده می شوند که در کشتهای مخلوط و Mix colture مشکل می توان کلنی جدا جدا و منتقل از پروتئوس یافت، بعلت عدم دقت کافی از نقل و انتقال کلنی های کشت مدفوع بیشتر اوقات کشت خالص (Pure colture) میکروبیهای دیگر با پروتئوس مخلوط می گردند.

بعلت لاکتوز منفی بودن و تولید گاز SH_2 بر روی خیلی از محیطهای انتخابی و جدا کننده انتر و باکتریاسه های پروتئوسها با سالمونلاها اشتباه می شوند.

اما با توجه به اوره آز (+) بودن پروتئوسها و آزمایشات دیگر راه شناسائی آنها از یکدیگر

هموار می گردد (جدول)

فرق بین پروتئوس میرابلیس و ولگاریس در مثبت بودن اندول برای ولگاریس و منفی بودن آن در میرابلیس است.

ولگاریس قند مالتوز را تخمیر نموده و ارنیتین دی کربوکسی لازم منفی است و میرابلیس برعکس مالتوز منفی و ارنیتین دی کربوکسی لازم مثبت است.

اختصاصات بیوشیمیائی پروتئوسها و تفاوت آنها بدین صورت است.

از لحاظ آنتی ژنتیک پروتئوسها مورد علاقه میکروبیولژیستها می باشد. زیرا آنتی ژن O

متعلق به پروتئوسها با سرم افراد مبتلا به تیفوس ایجاد آگلوتینا سیون می نماید که به نام

راکسیون وایل فلیسکس خوانده می شود.

اختلافات فنوتیپیک در دو اندازه سلول پروتئوس میرابلیس:

اندازه سلولهای این باکتری با مرحله رشد متناسب بوده و بسیار متفاوت است. لام تهیه شده (۲۷۸) از لبه Swarm باکتری پس از ۷ ساعت رشد در ۳۷ درجه سانتی گراد برداشته شده است. این باسیلها بسیار بزرگ نمونه ای کاملاً تیپیک مرحله Swarming پروتئوس میرابلیس بوده و دارای فلاژلهای متعدد می باشند لام (۲۷۹) پس از انجام ۴۸ ساعت رشد و پس از متوقف شدن Swarming تهیه شده است که در آن سلولهای کوچک کاملاً تیپیک آنتروباکتریاسه دیده می شوند.

واکنشهای بیوشیمیایی گونه از سرگروههای پروتئوی

تست	پروتئوس میرابلیس	پروتئوس ولگاریس	پروویدانسیاه ا آلگافیشنز	پروویدانسیاه اتسوارتیای	پروویدانسیاه رتگری	مورگانلا مرگانی
اینوزیتول	-۰	-۰	-۱	+۹۷	+۹۳	-۰
D-سوربیتول	-۰	-۰	-۰	-۱	-۳	-۰
L-آرینوز	-۰	-۰	-۱	-۴	-۰	-۰
رافینوز	-۰	-۰	-۱	-۵	-۹	-۰

بارامینوز	۲	-۹	-۰	-۰	V۷۵	-۰
مالتوز	-۱	+۹۶	-۱	-۳	-۲	-۰
D- گزیلوز	+۹۶	V۸۹	-۱	-۶	V۱۵	-۰
تری هیلوز	۹۸	V۳۰	-۴	+۹۹	-۱	-۷۱۴
سلیبوز	-۲	-۰	-۱	-۱۰	-۴	-۰
α -گلوکوسید	-۰	V۸۰	-۰	-۰	-۹	-۰
آدرینتول	-۰	-۳	-۰	-۰	V۷۸	-۰
اسکیولین	-۱	V۵۹	-۰	-۰	V۳۰	-۰
مالیبیوز	-	-	-	-	-	-
D- آرابیتول	-	-	-	-	-	-
تست	پروتئوس میرابلس	پروتئوس ولگاریس	پروویدانسیاه ۱ آلگافیشنز	پروویدانسیاه اتسوارتیای	پروویدانسیاه رتگری	مورگانلا مرگانی
موکات	-۰	-۰	-۰	-۰	-۰	-۰
جردن لارتریت	V۸۸	+۹۳	+۱۰۰	+۹۶	+۹۶	+۹۳
لیپاز	+۹۲	V۸۷	-۰	-۰	-۰	-۰
اورتونیتروفنیل	-	-	-	-	-	-
بناگلاکتوز	-	-	-	-	-	-

پیرانسید						
تیروزین - کلیرینگ	+	+	+	+	+	+
پکیثیت	-	-	-	-	-	-
اندول	-a2B	+98	+90	+99	+100	+99/5
متیل رد	+99	+93	+99/9	+100	+93	+97
پروسکائر	V19	-0	-0	-0	-0	-0
سیمون سیترات	V88	V11	+98	+93	+96	-0
SH ₂ و TST	+94	+95	-0	-0	-0	-
اوره	V88	+95	-0	V15	+99	+98
فنیل آلانین	+90	+100	+97	+95	+98	+95
تست	پروتئوس میرابلس	پروتئوس ولگاریس	پروویدانسیاه ا آلگافیشنز	پروویدانسیاه اتسوارتیای	پروویدانسیاه رتگری	مورگانلا مرگانی
د- آمیناز	+90	+100	+97	+95	+98	+98
آرژنین هیدورلاز	-0	-0	-0	-0	-0	-0
اورنتین دکربوکسیلاز	+99	-0	-1	-0	-0	+97
حرکت در 36° C	+95	+95	+95	V85	+94	V88
ژلاتین - 22° C	+22	+91	-0	-0	-0	-0

KCN	+۹۹	+۱۰۰	+۹۹	+۹۹	+۹۷	+۹۹
D- گلوکز- اسید	+۱۰۰	+۱۰۰	+۱۰۰	+۱۰۰	+۱۰۰	+۱۰۰
D- گلوکز- گاز	+۰۶	+۸۶	V۸۵	-۰	V۱۲	V۸۶
اسید از: لاکتوز						
ساکارز	-۲	-۰	-۱	-۴	-۵	-۰
D- مانیتول	V۱۹	+۹۵	V۱۳	V۳۱	V۱۳	-۱
دوسیتول	-۰	-۰	-۰	-۰	-۰	-۰
سالیسین	-۱	V۸۵	-۱	-۲	V۵۰	-۰
ادیتول	-۰	-۰	+۹۴	-۴	+۹۹	-۰
تست	پروتئوس میرابلس	پروتئوس ولگاریس	پروویدانسیاه ۱ آلگافیشنز	پروویدانسیاه اتسوارتیای	پروویدانسیاه رتگری	مورگانلا مرگانی
ملونیت	-۲	-۰	-۰	-۰	-۱	-۵
گلیسرول	+۹۰	V۷۹	V۱۲	V	V۵۹	-۵
استات سدیم	V۱۳	V۲۳	V۳۰	V۸۱	V۵۹	-۰

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

پروتئوس رنگری P, rettgi انواع چهارگانه فوق با فعل و انفعالات مختلفی که در آزمایش T
M . C . و بعضی از آزمایشات بیوشیمی دیگر نشان می دهند و به آسانی تشخیص می باشند
و بر اساس آنتی ژنهای O و H بانواع مختلف سرو لوژیک قابل تقسیم اند بعلت تشابه و
اشتراک ژنهای O بین پروتئوسها ریکتزیایها از شیرابه های میکروبی پروتئوس در آزمایش
فلیکن برای تشخیص سرولوژیک بیماری تیفوس استفاده می کنند.

نمونه ای کاملاً تیبیک ظهور حالت Swarm در پروتئوس ها. سایر پروتئوس ها به وسیله
خط نازکی از یکدیگر جدا شده اند. از ۴ نمونه ای که در نزدیکی لبه پلیت تلقیح شده اند
فقط یکی از آنها با نمونه تلقیح شده در مرکز همولوگ است.

www.kandoo.cn.com

شکل فوق نشاندهنده حرکت پروتئوس ها به نام "Swarming" می باشد:

پروتئوس میرابلیس و پروتئوس ولگاریس (که برخلاف اسمش خیلی کمتر از پروتئوس

میرابلیس دیده می شود) هر دو بر روی محیط های معمولی کشت آزمایشگاهی تشکیل

CSwarm را می دهند. در نتیجه این عمل خطوط متناوبی در اطراف نقطه تلفیح باکتری

دیده می شوند. این خطوط نشان دهنده رشد تناوبی و است. این هاله ها در روی محیط

های مرطوب به خوبی دیده نمی شوند. چون در این کشت ها میکروارگانیسم بدون توقف

تولید Swarm می کنند.

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

خصوصیات بیوشیمیایی گونه ها پروتئوی

تست	پروتئوس میرابلیس	پروتئوس ولگاریس
آدنیترول	-	-
	-	-
گلوکز	(گاز) +	(گاز) +
	-	-
لاکتوز	-	-
مانیتول	-	-
سالیسن	متفاوت	+
	(۳ تا ۸ روز) +	+
مالٹوز	+	+
گزیلوز	+	+
ژلاتین	+	+
	+	+
اندول	-	+
متیل رد	+	+
وگزر- پروسکائو	+ یا -	-
سیمون سیتراک	(متفاوت) +	(متفاوت) -
فنیل آلاتین دامیناز	+	+
اورتین دکربوکسیلاز	+	-

پروتئوسها اوره آز مثبت می باشند

عفونتهای پروتئوسی:

پروتئوسها تولید بعضی بیماریها را می نمایند که از لحاظ کلینیکی و تشخیص حائز اهمیت است. پروتئوس میرابلیس (Proteus Mirabilis) عامل ۷۵ تا ۹۰ درصد عفونتهای انسانی است و تفکیک آن از سه نوع دیگر بر اساس عدم توانایی آن در تشکیل اندول استوار است. هر چهار نوع اوره را تجزیه کرده و آمونیاک بوجود می آورند، بعضی از سوشهای پروتئوس ولگاریس با برخی از ریکتزیها در داشتن آنتی ژنی اشتراک دارند و این دلیل پیدایش آنتی کورهائی را بر علیه پروتئوسها در بیماری تیفوس (واکنش Well – Felix) و Scrub typhus , Rocky Mounta in spotted fever توصیه می کنند، ارگانیسهای گروه پرویدانس با ارگانیسهای جنس پروتئوس شباهت نزدیکی دراند و تنها تفاوتشان در این است که قادر به ایجاد داوره از نیستند.

اپیدمیولژی و پاتوژنسیته:

ارگانیسها متعلق به جنس پروتئوس به طور طبیعی در خاک و آب و زباله یافت می شوند و بخشی از فلور طبیعی مدفوع را تشکیل می دهند، گاهی آنها در ایجاد اسهال اپیدمیک اطفال دخیل هستند ولی مدارک همگی بر علیه این عقیده در دست نیست. این ارگانیسم اغلب از کشت زخمهای سطحی ترشحات گوش و خلط بویژه در بیمارانیکه آنتی بیوتیک دریافت نکرده اند بدست آمده و جانشین فلور حساس می شود که توسط این دارو ها ریشه کن می گردد. پروتئوسها غالباً در بافتهایی که قبلاً ضایعه دیده اند مستقر می گردند و در آنجا واکنش اگزوداتیو آماسی و تیپیکی بوجود می آورند.

تظاهرات بالینی:

پروتئوسها بندرت بطور اولیه به نقطه ای از بدن تهاجم پیدا می کنند ولی در نقاطی که قبلاً توسط ارگانیسهای دیگری دچار آلودگی شده ایجاد بیماری نمایند، این نقاط عبارتند از: پوست، گوشها و سینوسهای ماستوئید، چشم، حفره صفاتی، استخوان، مجرای ادراری، مننژ، ریه و جریان خون.

عفونتهای جلدی:

پروتئوسها اغلب از زخمهای حاصل از جراحی، بخصوص بعد از درمان ضد میکروبی ایزوله می شوند، مشروط بر اینکه بافتها زنده بوده و اجسام خارجی موجود نباشند لطمه ای به التیام طبیعی زخم وارد نمی کنند، سوختگی ها، زخمها واریسی و زخمهای ناشی از بستری طولانی (decobitus) گاهی با پروتئوسها آلودگی پیدا می کنند و اغلب ارگانیسهای گرم منفی دیگر با استافیلوکوکها نیز در این آلودگی دست دارند. عفونتهای گوش و سینوسهای ماستوئید:

وجود پروتئوسها دراوتیت گوش میانی و ماستوئیدیت می تواند سبب تخریب وانهدام وسیع گوش میانی و سینوسهای ماستوئید گردد. ترشح متعفن گوش (fetid otorrhea)، کلمه استسئاتوم و بافت گرانگولاسیون، کانون مزمنی از عفونت در گوش میانی و داخلی و ماستوئید بر پا می کند که به دنبال آن کری عارض می شود. فلج عصب صوتی (Parakysis of the - facial nerve) یکی از عوارض اتفاقی بیماری است. خطر بزرگ این عفونتها در توسعه آنها بدرون (intracranial entensien) است که موجب ترمبوز سینوس جانبی مننژیت، آبسه مغز و باکتری می گردد.

عفونتهای چشمی: OCULAR INFECTIONS

عفونت پروتئوسی می تواند موجب بروز زخم قرنیه (OCULAR INFECTIONS) شود. این کیفیت معمولاً بدنبال وارد آمدن ضربه به چشم پیش آمده و گاهی منجر به پان افتالمین و تخریب کره چشم می گردد.

پریتونیت:

از آنجائیکه پروتئوسها بخشی از فلور طبیعی روده را تشکیل می دهد گاهی بدنبال پرفوراسیون احشاء یا انفارکتوس مزانتریک می توان آنها را در حفره صفاقی پیدا کرد. عفونتهای مجاری ادراری:

پروتئوسها علت شایع عفونتهای مجاری ادراری هستند که معمولاً در بیماران مبتلا به باکتریوری مزمن که تعداد زیادی از آنها قبلاً دچار اوروپاتی انسدادی بوده سابقه اسباب گذاری در مثانه و روده های مکرر شمیوترابی داشته اند دیده می شود، این ارگانسیم چنانچه مجاری ادراری از نظر آناتومی دچار اختلالی نباشد بندرت بیماریزایی دارد مگر گاهی در بیماران مبتلا به دیابت قندی همچنین پروتئوسها را اغلب می توان از گشت ادرار باکتریوریکی بیماران که دچار سنگ کلیه یا مثانه هستند به دست آورد، این امر احتمالاً مربوط به خاصیت آمونیاک زائی این ارگانسیم است که موجب قلیایی شدن ادرار شده و محیط مساعدی برای تشکیل سنگهای فسفات- منیزیم- آمونیم بوجود می آورد.

باکتری یمی:

تهاجم پروتئوس به جریان خون خطرناک ترین تظاهر عفونت با این ارگانسیم است. در ۷۵ درصد از موارد راه ورود میکروب را مجاری ادرار تشکیل می دهند، و در بقیه موارد مجرای صفراوی لوله معدی روده است، گوش و سینوسها، پوست، کانونهای اولیه به شمار می روند.

غالباً قبل از باکتری می پروتئوسی، سسینوسکویی، سوندگزار، پیشابراه رزکسیون پروستات از راه پیشابراه.

Transurethral prostatic resection

یا اقدامات جراحی دیگر صورت گرفته است. از لحاظ بالینی، نشانه ها، علائم و یافته های آزمایشگاهی سیتی سمی پروتئوسی یعنی تب شدید، سوز، شوک آبسه های متاستاتیک، لکوسیتوز و ندرتاً ترومبوسیتوپنی، از تهاجم عفونتهای ناشی از سایر باکتریها گرم منفی بخون غیر قابل تفکیک است.

تشخیص:

تشخیص عفونتهای پروتئوسی به کشت ارگانیزم از خون، ادرار، یا اگزودا، و تعیین هویت آن به کمک تست های بیوشیمیایی مناسب، بستگی دارد، تفکیک پروتئوس میرابلس که اندول منفی است از پروتئوس مرگانی و رتگری و ولگاریس که اندول مثبت اند حائز اهمیت است، زیرا فقط میرابلس در برابر اثر پنی سیلین و بیماری آنتی بیوتیک دیگر حساسیت دارد، پروتئوسها اغلب در عفونتهای همراه با پاتورنهای دیگر یافت می شوند. لازم است جهت ایزولاسیون سایر ارگانیزمها که در یک محیط با پروتئوسها رشد می کند دقت خاص مبذول شود چه در غیر این صورت رشد پراکنده پروتئوس آنها را از نظر مخفی می دارد.

همچنین خاصیت رشد پراکنده این ارگانیزم گاهی تفسیر تستهای حساسیت آنتی بیوتیکی را دشوار می سازد.

درمان:

اکثر سوشهای پروتئوسی میرابلیس نسبت به غلظت زیاد پنی سیلین (۱۰ واحد یا بیشتر برای هر میلی لیتر) و نیز آمپی سیلین، کارپنی سیلین، کانامایسین، سفالوتین و کلرامفیل حساسند. باکتریوری پروتئوسی را می توان در جریان درمان با هر یک از این داروها بسهولة ریشه کن نمود و برای این منظور آمپی سیلین با دوز ۰/۵ در هر ۴ تا ۶ ساعت بسیار مؤثر می باشد. در عفونتهای شدید درمان باید بشکل تزریقی باشد و برای این منظور چنانچه در فونکسیون کلیه اختلالی نباشد. لازمست مقدار ۶ تا ۱۲ گرم آمپی سیلین یا ۲۰ میلیون واحد پنی سیلین G همراه با ۱ تا ۱/۵ گرم کانامایسین در روز تجویز گردد.

شواهد موجود به خوبی نشان می دهند که کانامایسین در عفونتهای پروتئوسی با آمپی سیلین و پنی سیلین اثر سینرژیک داشته و نیز کلرامفینیتل علیرغم اثر مطلوبی *Invitro* نشان میدهد، ممکن است مفید واقع نشود، نظر به وجود مقدار زیاد داروی مؤثر دیگر جانی برای استفاده از کلر امفیکل در عفونتهای پروتئوس باقی نمی ماند، بطور کلی تمام سوشهای پروتئوسی در مقابل تتراسیکلین مقاومند، باستثناء میرابلیس و باسیلهای پرویدانس اکثر پروتئوسهای دیگر فقط به کانامایسین حساسید دارند، چنین به نظر می رسد که جتتامایسین که آمینوگلیکوزید جدید تری است بر پروتئوس های اندول مثبت چه در محیط خارج از بدن و چه در بدن دارای اثر بسیار مفیدیست، بعلاوه گرچه آمپی سیلین و پنی سیلین به تنهایی بر پروتئوس اندول مثبت بی اثرند. معهدا مجموعه هر یک از این داروها با کانامایسین که یک پنی سیلین نیمه صناعی است بر اکثریت پروتئوسها اندول مثبت مؤثرند.

در عفونت پروتئوس مانند هر عفونت گرم منفی دیگر باید دقت خاصی جهت درناژجرک
برقراری تعادل آب و الکترولیت و درمان کلاپس گردش خون مبذول گردد.

۱-هدف:

پی بردن به خصوصیات بیوشیمیایی دستجات مختلف پروتئوسها می باشد که از جمله
میرابلیس و مرگانی می باشند و در مقام مقایسه قرار دادن این دو گونه که میزان ترشح آنزیم
اوره آز کدامیک بیشتر و کدامشان در شرایط معمولی تولید آنزیم مینمایند و کدام در مجاورت
اوره این کار را انجام می دهد و زمان تقسیم یا رشد آنها در مجاورت با اوره چه اختلافی با
یکدیگر دارند و همچنین پی بردن به اینکه کدامیک در رقابت مصرف مواد غذایی بهره
منداست، در این رابطه با مدت زمان تقسیم سلولی ارگانسیم می باشد و نکته بعدی اینکه میزان
تولید اوره آز در میرابلیس و مرگانی به چه نحو است و کدامیک بیشتر تولید می نمایند.

مواد و روشها:

کشت خطی بر روی محیط های SS و Mc Conkey و قرار دادن در اتو ۳۷ درجه به
مدت ۲۴ الی ۱۸ ساعت و یادداشت نمودن مشخصات کلنی های بدست آمده از سوی پلیت
های SS را وزن نموده و در ۲۵۰ درجه سانتی گراد آب حل کرده و روی چراغ گذشته و
مرتباً با همزن هم می زنیم تا کاملاً پودر حل گردد و زمانی که به نقطه جوش رسید ۱ تا ۲ دقیقه
در جوشیدن باقی می ماند و بعد چراغ الکلی را خاموش می نماییم تا محلول تا حدودی سرد
شود.

احتیاج به اتو ندارد و بعد در پلیت های استریل تقسیم نموده

طرز تهیه محیط Mc Conkey:

محیط مکانکی را وزن نموده در آب حل می نمائیم و می جوشانیم و بمدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ اتو کلاو می نماییم، بعد از بیرون آوردن از اتوکلاو در پلیت های استریل تقسیم بندی می نماییم و بعد از بسته شدن در پلیت آنها را در یخچال نگهداری می کنیم.

کشت کلنی های جدید از روی محیط Mc Conkey و SS بر روی TST

Slant و محیط TST همانطور که قبلاً ذکر کرده ایم دارای سه نوع قند گلوکز لاکتوز و سوکروز بهمراه فنل رد و سولفرو آهن می باشد که جمعاً تخمیر فندها و تولید SH_v در (سیاه شدن ته لوله) در محیط را نشان می دهد و لوله ها را در اتو ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۲۴- ۱۸ ساعت قرار می دهیم و سپس خصوصیات هر یک از لوله های مذکور را یادداشت می نماییم.

کشت بر روی محیط ژلز ساده:

کشت تک کلنی هر گونه از جنس پرتئوس بر روی محیط ژلز ساده Slant و کشتها اتو c ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۲۴ ساعت قرار داده و بعد از این مدت با استفاده از ۵ml سرم فیزلژی زمان در هر کدام از لوله ها محلول سوسپانسیون سرم و میکروب رشد یافته می نماییم، از سه سوش طی شماره های P. M/۳ و ۱۳۹/۱ و ۱۲۰/۴ برای استفاده در مرحله چهارم استفاده از تستهای اختصاصی:

استفاده از تستهای اختصاصی برای پی بردن بخصوصیات بیوشیمیایی هر گونه به نام Api

سیستم که تشکیل شده از ۱۰ عدد قایقکهای مخصوص هر تست قایقک شماره ۱ تست

ONPG که مخفف کلمه ارتونیتروفنیل بتا- گالاکتوز پیدانسیداز (۱ - nitropheny - Orto

(beta - galactopyranoside) در صورت ایجاد رنگ زرد نتیجه آزمایش + است و این به علت آزاد شدن ارتونیتروفنل می باشد. یعنی باکتری دارای آنزیم تخمیر لاکتوز است و جزء باکتری های لاکتوز (+) دسته بندی می گردد.

آزمایش ONPG:

آزمایشهای استاندارد برای تخمیر لاکتوز می توانند نشان دهند که لاکتوز به دو قند متشکله یعنی گلوکز و گالاکتوز تجزیه شده است ولی این آزمایشها تنها در صورتی کافی هستند که باکتری مورد آزمایش هم دارای لاکتاز پرمه آز (Lectose permease) و هم دارای بتا - گالاکتوزیداز (galactosidase -) آنزیمی است که مسئول شکستن لاکتوز می باشد.

این آنزیم درون سلولی به نام لاکتاز نیز خوانده می شود و در گروه کلی آنزیمهایی قرار دارد که هیدورلاز نامیده می شوند. دسته ای از این باکتری ها این آنزیم را تولید می کنند ولی آنزیم «لاکتاز پرمه آز» را به وجود نمی آورند. «لاکتاز پرمه آز» به مولکول لاکتاز امکان می دهد که وارد سلول شود. در صورتیکه یک باکتری دارای آنزیم «بتا-گالاکتوزیداز» بوده ولی فاقد «لاکتاز پرمه آز» باشد، به آزمایشهای استاندارد لاکتاز پاسخ منفی خواهد داد. آزمایش ONPG به منظور شناسایی باکتریهای انجام می گیرد که دارای آنزیم «بتا گالاکتوزیداز» بوده ولی فاقد «لاکتاز پرمه آز» می باشند.

شناسایی فعالیت «بتا-گالاکتوزیداز» در این دسته از باکتریها با استفاده از ارتونیتروفنیل - بتا

د - گالاکتوزیداز D - galactoside Onitritrophenyl - حداکثر فعالیت «بتا-

گالاکتوزیداز» به صورت استخراج شده در PH تا می باشد، O دامنه PH آنزیم در سلول

ممکن است وسیعتر باشد. O- نیتروفنیل در PH قلیایی- زرد است، اگرچه این ماده یک اسید ضعیف است محیط کشت باید با PH شده یا قلیایی باشد زیرا اسید تفکیک نشده بیرنگ است. حدود ۷/۵ مناسب است زیرا O- نیترو فنیل را از حالت زرد نگاهداشته و هر چند برای فعالیت «بتا-گالکتوزیداز» مناسب است برتری دیگر ONPG بعنوان «فرولايه» برای بتا گالاکتوز این است که نسبت به هیدرولیز ONPG بسیار بالا است در حضور مقادیر زیاد آنزیم ONPG ممکن است در مدت چند دقیقه هیدرولیز گردد و رنگ زرد در همین زمان پدیدار می شود.

سلولهای دست نخورده دارای فعالیت زیاد «بتا-گالاکتوزیداز» می باشد و با به کار بردن مقدار زیادی از باکتری که قبلاً کشت داده شده و این آنزیم را قبلاً تولید کرده باشند و استفاده از حجم کم «فرولايه» آزمایش معمولاً در مدت ۱ ساعت مثبت خواهد شد، امروزه به خوبی پذیرفته شده است. که «بتا-گالاکتوزیداز» یک آنزیم «القا پذیر» می باشند. اگر چه در بعضی از انواع جهش یافته Ecoli ممکن است «ساختمانی» باشد، گلوکز برای «بتا-گالاکتوزیداز» یک بازدارنده است و نشان داده شده باکتری ها که در حضور گلوکز (ONPG) امکان پذیر می باشد. ONPG بوسیله همان آنزیمی که لاکتوز را هیدرولیز می کند تجزیه می گردد (۱) و توسط «لدبرگ» (ledorberg) (۲) از آزمایشهایی که بر روی بتا - گالاکتوزیداز انجام گرفت، استفاده شد.

یکی از مزایای استفاده از ONPG در نشان دادن فعالیت بتا - گالاکتوزیداز در این است که

ONPG بیرنگ است ولی یکی از مواد حاصل از هیدرولیز آن یعنی

O - nitrophenol زرد رنگ می باشد. بنابراین تغییر رنگ محیط از بیرنگ به زرد نشان

وجود فعالیت بتا - گالاکتوزیداز و مثبت بودن آزمایش می باشد واکنش مربوط در زیر نشان

داده شده است.

کشت داده شده اند در مقایسه لاکتر فعالیت با کمتر آنزیمی دارا هستند، در آزمایش ONPG

آن چنان که توسط «اونینگ» شرح داده شد باکتری ها باید در محیط کشت لاکترزادار مانند

TST کشت داده شوند.

هیدورژن سولفور : Hydrogen sulphide

باکتریها ممکن است از ترکیبات آلی گوگرد دار که در پیتون محیطهای کشت وجود دارد و

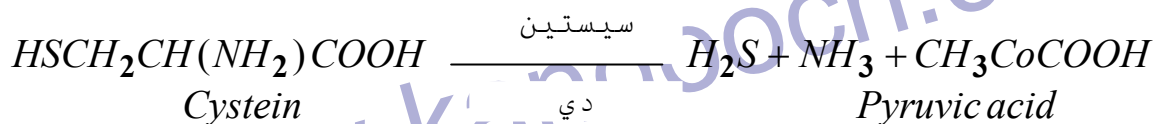
یا ترکیبات معدنی گوگردار که به محیط افزوده شده اند SH_2 تولید نمایند که نشان دهنده

توانایی باکتری در احیاء گوگرد و تبدیل آن به سولفید می باشد، گروهی از دانشمندان بدنی

باورند که تولید SH_2 از ترکیبات آلی به علت وجود آنزیم «سیستن و سولفیداز» که قبلاً

سیستئیناز نامیده می شد می باشد که بر روی سیستن موجود در پیتون اثر می کند واکنش

کلی را میتوان به صورت زیر نشان داد.

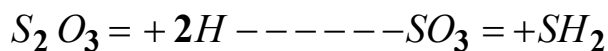


سیستین نیز ممکن است بعنوان منبعی برای تولید SH_2 مورد استفاده قرار گیرد. ولی ابتدا باید به سیستین تبدیل شود، دسته دیگری پیشنهاد کرده اند که آنزیم سیستین و سولفیداز مشابه سیستاتیوناز (Cystathionase Cystathionase) می باشد. و منبع گوگردی در واقع بیشتر سیستین است با سیستین بنابرین در یک محیط شیمیایی با فرمول مشخص که منبع گوگردی آن سیستین است برای تولید SH_2 سیستین باید اکسیده شده و به سیستین تبدیل گردد اگرچه این پژوهندگان تذکر داده اند که در سلولهای سالم راههای دیگری نیز برای تولید SH_2 ممکن است وجود داشته باشد.

چنانچه قبلاً گفته شد تولید SH_2 می تواند توسط ترکیبات معدنی گوگرد دار نیز تولید گردد. تیلی (Tilley) دریافت که میزان گوگرد احیا پذیر در پیتونها بسیار متغیر است. به نظر او اضافه کردن تیوسولفات بعنوان منبع که بین این اختلاف را جبران خواهد کرد ولی توصیه می گردد که به محیطهای کشتی که برای آزمایش تولید SH_2 به کار می روند تیوسولفات افزوده شود.

محیطهایی که می باید به طور معمول برای مشاهده تولید SH_2 به کار می روند مانند محیطهای سه قندی آهن دار (TSI) و محیط آهن دار کلیگر (Keligler) در ترکیب خودداری تیوسولفات به عنوان منبع معدنی گوگرد می باشند «تاری» Tarr دریافت که تولید SH_2 از تیو- سولفات از راه مکانیسم دیگری صورت می گیرد که با تولید SH_2 از سیستین متفاوت می باشند. به نظر می رسد که تیوسولفات در حضور یک آنزیم باکتریائی (احتمالاً یک تیوسولفات ردوکتاز) و یک عامل احیاء کننده که می تواند به عنوان هیدورژن عمل کند احیا

شده و به سولفید تبدیل گردد. ترکیباتی مانند سیستین و گلووتاتیون می تواند بعنوان دهنده هیدروژن عمل کنند واکنش کلی را می توان به شرح ذیل نشان داد:



از آنجائیکه در واکنش تولید SH_2 از ترکیبات آلی و یا معدنی گوگرددار آنزیمهای مختلفی دخالت دارند، نتایج آزمایشهای SH_2 برحسب نوع محیط و ترکیب آن فرق خواهد کرد، به عنوان مثال E . Coli در محیط TSI هیدروژن سولفور تولید نمی کند ولی در محیطی که دارای مقادیر زیادی سیستین باشد ممکن است هیدروژن سولفور تولید کند. بنابراین مسلم است که نتایج آزمایش تولید SH_2 تنها زمانی می تواند با یکدیگر مقایسه شوند که در همه موارد محیط کشت یکسان بکار رفته شود. تغییر دیگری که در آزمایشهای تولید SH_2 وجود دارد نوعی معرفی است که برای شناسایی SH_2 به کار می رود، املاح سولفید بسیاری از فلزات سنگین همچون سرب بسموت و آهن سیاه رنگ می باشند و از این رو املاح هر یک از این تغییرات در آزمایش به کار رفته است. زوبل (Zobell) و فلتن (Falthan) شایستگی هر یک از این فلزات را مورد ارزشیابی قرار داده و دریافتند که از این میان املاح آهن از همه بهتر بوده و مانع از رشد باکتری نمی شود. محیطهایی چون TSI و گیلگنر دارای املاح آهن دو ظرفیتی می باشند. این های قرمز با ترکیب شده و رسوب سیاه رنگ سولفید فرو را تولید می نمایند و محیطهایی که دارای املاح فریک هستند نیز در اثر تشکیل SH_2 رسوب سیاه رنگ تولید می نمایند زیرا پس از اتوکلاو کردن محیط کشت و رشد میکرو ارگانیسمها به علت تغییر پتانسیل اکسیداسیون و احیاء این های فریک و فرو هر دو در محیط وجود خواهند داشت. (۸)، اگر چه استارت سرب معرف بسیار حساسی به شمار می رود ولی وجود آن در محیط کشت

از رشد تعدادی از باکتریها جلوگیری می کند ولی اگر نوارهای کاغذی آغشته به استات سرب در بالای محیط کشت قرار گیرد تولید شده که فرار می باشد با آن ترکیب شده و کاغذ را سیاه رنگ می کند امروزه نیز روش نوارهای کاغذی آغشته به استات سرب حساسترین روش برای شناسائی تولید SH_2 در صورت وجود یک ترکیب احیا پذیری گوگردی در محیط کشت میباشد، اگرچه این احتمال نیز وجود دارد که حساسیت بیشتر از اندازه استات سرب ممکن است در اثر ترکیب این ماده با ترکیبات دیگر گوگردی حاصل از متابولیسم بجز SH_2 می باشد. رادلر (Radler) و همکارانش نشان دادن که در مورد E. Coli رنگ سیاه تولید شده در آزمایش استات سرب ناشی از ترکیب مرکاپتانهای Mercaptanes تولید شده از سیستمین می باشد. آنها نتیجه گیری کردند که آزمایشهای تولید SH_2 تنها باید از املاح آهن استفاده کرد زیرا این املاح با مرکاپتنها ترکیب نمی شوند. SH_2 مطالعات آنها لزوم آزمایشهای بیشتر در مورد استات سرب را به عنوان یک معرف SH_2 نشان می دهد.

یادآوری می گردد که تولید SH_2 یک ویژگی مطلق نیست بسیاری از میکروارگانیسمها قادر به تولید SH_2 و در صورتیکه روشهای بسیار حساس به کار برده می شود میتوان وجود SH_2 را شناسائی کرد به عنوان مثال احتمالاً تمامی افراد خانواده انتروباکتریاسه ها توانائی تولید SH_2 را دارا می باشند اگر چه با بعضی از روشها، این توانایی قابل جستجو نیست از این رو در شناسائی میکروارگانیسمها لازم است که از روش توصیه شده استفاده گردد:

DEAMINASE TESTS

آزمایش د آمیناز:

توانائی باکتری های جنس پروتئوس *Proteus* , *Providencia* در دامینه کردن تعدادی از اسید های آمینه یکی از روشهای بازشناسی این باکتری ها از باکتری های دیگر خانواده اند و باکتریاسه ها می باشند. در اوایل سده بیستم تعداد زیادی از پژوهشگران متابولیسم اسیدهای آمینه توسط باکتری ها را مورد مطالعه قرار دادند. «برانهایم» (Bornhein) و همکارانش در سال ۱۹۳۵ با به کار گرفتن یکی از سویه های *Proteus* توانائی این باکتری را در اکسیده کردن اسیدهای آمینه مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که تمام ایزومرهای نوری طبیعی بیش از ۱۰ اسید آمینه که توسط آنها مورد آزمایش قرار گرفته بودند، توسط این باکتری اکسیده شده، این پژوهشگران اظهار داشتند که اکسیداسیون این اسید آمینه با دامینه شدن آنها همراه است. در این آزمایش ها از کشت ۱۸ ساعته پروتئوس که بر روی محیط شیدار عصاره گوشت کشت داده شده بود استفاده گردید، این پژوهشگران این کشت را کشت آسوده پروتئوس (*Restring cululture*) نامیدند، سوسپانسیون فسفات باکتری ها به طور جداگانه به لوله هایی که اسید های آمینه به طور جداگانه در بافر فسفات حل شده بودند افزوده گردید. و میزان شدت تولید اکسیژن توسط دستگاه واربورگ اندازه گیری شد. PH «دلخواه» *Optimam* برای اکسیداسیون اسیدهای آمینه بین $7/2 - 8/3$ تعیین گردید. استامپ (Stumpf) و گرین، Green نیز در سال ۱۹۴۴ به طور جامع تر روشهای گاز سنجی را برای مطالعه آنزیم اکسیداسیون پروتئوس ولگاریس به کار بردند. این دو آزمایش های خویش هم از سلولهای دست نخورده باکتری و هم از عصاره های بدون سلول باکتری استفاده کردند، آنها این آنزیم را ال- آمینو اسید اکسیداز (*L- amino acid oxidaxse*) نامیدند. که این نامگذاری تا امروز نیز معتبر است. این پژوهشگران دریافتند که از ۲۲ اسید آمینه مورد آزمایش

۱۱ اسید آمینه توسط آنزیم آمینو اسید اکسیداز دآمین می شود و سریعترین واکنش در مورد فنیل آلانین رخ میدهد. آنها متوجه شدند که سرعت واکنش دآمیناز در اسیدهای آمینه غیر منشعب بستگی به تعداد اتمهای کربن موجود دارد و اسیدهای آمینه ای که دارای ۶ اتم کربن هستند که اکثر سرعت را دارا می باشند در اسیدهای آمینه حلقوی سرعت واکنش بستگی به تعداد اتم های کربن موجود در زنجیره کناری دارد و از این میان فنیل آلانین با دارا بودن ۳ اتم کربن در زنجیره کناری سریعتر از همه اسید آمینه های آزمایش شده، اکسیده می گردد اسید آمینه های آمینه ای که دارای تعداد اتمهای کربن کمتر هستند توسط آنزیم اکسیده نشده و اسیدهای آمینه ای که دارای اتمهای کربن می باشند با سرعت بسیار کمتری اکسیده می گردند، استامپ و گرین فرمول زیر را برای اکسیداسیون اسیدهای آمینه توسط آنزیم آمینو اسید اکسیداز پیشنهاد ذکر کردند.



به منظور تأیید صحت این تعادل استامپ و گرین ترکیبات هیدرازون کتواسیدهای حاصل را تهیه کردند «هنریکین» و کلاس (۳) تلاشهای خود را بر روی متابولیسم فنیل آلانین توسط سویه های *Proteus* متمرکز ساختند و در سال ۱۹۳۸ روش سریعی برای جستجوی فرآورده انتهائی دآمیناسیون اکسید اتیو این اسید آمینه یعنی اسید فنیل پیروویک ابداع کردند - سوسپانسیون غلیظی از باکتری مورد آزمایش در یک محلول بافر نمکی که دارای ال - فنیل آلانین بود تهیه گردید و وجود اسید فنیل پیروویک را با افزودن سولفات آمونیم فریک نشان دادند. در صورت وجود اسید فنیل پیروویک در محیط رنگ سبز تولید می گردد، نتایج مثبت در مدت ۱ دقیقه به دست می آید ولی حد اکثر تولید رنگ پس از یک ساعت از گرمخانه

گذاری حاصل می شود، در سال ۱۹۵ هنریکین (۴) در این روش تغییرات کوچکی داد، از جمله زمان گرمخانه گذاری را به چهار ساعت افزایش داد.

در سال ۱۹۹۵ سینگر و ولگانی (۵) کلروفریک را جایگزین سولفات آمونیم فریک کردند.

آنها باکتری مورد آزمایش را در محلول نمکی قرار داده و به آن از محلول نمکی اسید آمینه مورد آزمایش را به حجم برابر افزودند و مخلوط را به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه در دمای اتاق

توسط شیکر تکان دادند و سپس چند قطره کلروفریک به آن اضافه کردند، این پژوهشگران تعداد زیادی از باکتری های خانواده اترو باکتریاسه ها از جمله گونه های پروتئوس و

پرویدانسیاها را مورد مطالعه قرار دادند، بر پایه آزمایش های آنها روشن گردید که گونه های

مذکور می توانند اسید آمینه های ایزولوسین هستیدین، مالوسین، نورلوسین، میتونین، نوروالین،

تریپتوفان و فنیل آلانین را دامینه کنند. افزودن کلروفریک به سوسپانسیون باکتری و اسید آمینه

رنگهای متفاوتی تولید می کند که به کتواسید بوجود آمده بستگی دارد. بعنوان مثال این رنگ

برای هستیدین سبز برای لوسین بنفش خاکستری، برای ایزولوسین نارنجی، برای نورلوسین

نارنجی، برای میتونین بنفش برای نوروالین نارنجی و برای فنیل آلانین سبز می باشد. در مورد

تریپتوفان بعلا تولید اندول ۳- پیروویک اسید، رنگ قرمز آلبالویی تولید می گردد و از

آنجائیکه این رنگ پایدار می باشد این پژوهشگران توصیه کردند که تریپتوفان برای فنیل آلانین

در آزمایشهای روتین مورد استفاده قرار گیرد، زیرا رنگ تولید شده با این فریک و اسید فنیل

پیروویک که فرآورده دامینه شدن فنیل آلانین است بسرعت زایل می گردد. نکته جالب توجه

این است که در مورد اسید آمینه های آلانین، آرژنین، اسید اسپارتیک، سیستین، سیستین،

گلیسین، لیزین، اورنیتین، هیدروکس پرولین، سرین، تراونین، والین، و تیروزین پس از گرمخانه

گذاری با گونه های پرتئوسی و پرویدانسیها رنگ تولید شده توسط کلروفریک تقریباً هم‌رنگ معرف بوده و به آسانی از آن تمیز داده نمی شود. پژوهشهای بسیاری در مورد فعالیت فنیل آلانین دامیناز پرتئوس و پرویدانسیها انجام گرفته است. شاو (Shaw) و کلارک محیط آبگوشتی ساختند که در آن مالونات همراه با فنیل آلانین بکار رفته بود، اوینگ (Eving) دیویس (Davis) ریویس (Reavis) (V) این محیط را مورد ارزشیابی قرار دادند و توصیه کردند که اگر فقط مایع بکار برده می شود آبگوشت مالونات و فنیل آلانین بطور جداگانه باید مورد استفاده قرار گیرد بخشی از مطالعه آنها بر روی محیط فنیل آلانین آگار تشکیل می داد تولید اسید فنیل پیروویک در این محیط پس از ۴ ساعت گرمخانه گذاری قابل تشخیص بود و رنگ تولید شده در اثر افزودن کلرور- فریک در محیط آگار بیش از محیط مایع پایدار بود.

پس از پژوهشهای «واسیلیادیس Vasiliadis و پولیتی، ادرر» (Ederer) و همکارانش (۹) دریافتند که می توان فنیل آلانین و اوره را همراه با هم در بافری که دارای عصاره مخمر و فنیل رد به عنوان معرف باشد برای تشخیص Proteus از پرویدانسیس به کار برد در این محیط باکتری های اوره آز مثبت رنگ صورتی سیر تولید می کنند، پس از خواندن نتیجه آزمایش، اوره محیط را با افزودن چند قطره اسید کلرئیدریک رقیق، اسیدی کرده و سپس چند قطره محلول کلروفریک بدان افزوده می گردد. در صورت تولید اسید فنیل پیروویک رنگ سبز تولید می گردد. هنگامیکه «ادوارد» Edwards و Fife (فیف) (۱۰) در سال ۱۹۶۱ محیط لیزین آگار آهن دار (Lisine Iron Agar) را مورد استفاده قرار دادند هدف اصلی آنها شناسائی باکتریهای بیماریزا روده ای همچون Salmonella و Arijona بود که می توانند لیزین را دکربوکسیله نمایند.

این واقعیت که باکتریهای جنس پروتئوس و پرویدانس از نظر لیزین دکربوکسیلاز منفی بوده و از باکتریهای دیگر این خانواده متمایز می‌باشند یک تصادف مطلوب به شمار آمده، پروتئوس و پرویدانس در محیط لیزین آگار آهن دار، عمق محیط را زرد و سطح آنرا قرمز می‌کنند اگر معرف از محیط کشت حذف گردد سرتاسر محیط نارنجی رنگ می‌شود، بنا به نظر این پژوهشگران در اثر آمینه شدن لیزین توسط پروتئوس و پرویدانس رنگ نارنجی تولید می‌گردد که در حضور معرف بنفش، برموکرزول باعث قرمز رنگ شدن محیط می‌شود. به منظور تجسم واکنشهایی که در آمینه شدن فنیل آلانین و تریپتوفان روی می‌دهد فرمول این اسیدهای آمینه های حاصل و کمپلکس رنگی که با افزودن ین فریک به محیط متشکل می‌گردد و در زیر نشان داده شده است.

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

ماهیت دقیق کمپلکس های رنگینی که توسط فنیل پیروویک اسید و اندول پیروویک اسید وجود می آیند، شناخته نشده است. سیفر (Sifer) و هریس (Harris) اظهار کرده اند که واکنش فنیل پیروویک اسید باین فریک ممکن ناست شبیه به واکنش کلروفریک و تیوسولفات بوده و به صورت زیر نشان داده شود.



این دو پژوهشگر XA را یک فرآورده برگشت پذیر اکسیداسیون و فرآورده نهایی توصیف می کنند که دیگر باین فریک ترکیب نمی شوند.

این نظریه به توضیح این مطلب کمک می کند که چرا پس از افزودن باین فریک به محیط و کامل شدن واکنش در اثر اضافه کردن مقادیر بیشترین فرو یا فریک محیط رنگ تولید نمی

www.kandoo.cn.com

گردد، واکنشهای رنگین اندول پیروویک اسید با این فریک ممکن است مشابه آنچه که گفته شد باشد اگر چه پایداری رنگ قرمز، آلبالوئی نشان می دهد که حساسیت تعادلی کمتر می باشد.

اگرچه واکنش دامینه شدن بسیاری از اسیدهای آمینه از جمله فنیل آلانین و تریپتوفان بخوبی شناخته شده در مورد لیزین مسئله متفاوت است. نخستین فرآورده های دامینه شدن لیزین $\text{E-aminocaproic acid}$ - Mister - beto - E است ولی «میستر» (Meister) اشاره می کند که این ترکیب به طور خود به خودی به Piperidine - P تبدیل می گردد. این واکنش در زیر نشان داده شده است:

در حال حاضر اسید آمینه فنیل آلانین بیشتر از تمام اسیدهای آمینه دیگر در آزمایشهای آمینه اسید اکسیداز باکتریهای به کار می رود و نقش مهمی در شناسایی باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه ها ایفا می کند اگر چه کمپلکس آلبالوئی رنگ اندول پیروویک اسید با این

فریک که نتیجه ای از د آمینه شدن تریپتوفان است بیش از رنگ تولید شده در اثر د آمینه شدن فنیل آلانین پایدار است ولی تریپتوفان کمتر مورد آزمایش قرار گرفته است. چون بهای آن گرانتر بود.

UREASE TEST

اوره آز:

آزمایش اوره آز به طور معمول برای شناسائی باکتریهای جنس پروتئوس مورد استفاده قرار می گیرد. ولی باکتریهای دیگری نیز که از نظر پزشکی دارای اهمیت هستند اوره آز تولید می کنند، آنزیم اوره آز بر روی اوره موجود در محیط کشت اثر کرده و آنرا به آمونیاک انیدرید کربنیک و آب تبدیل می کند.

فرمول واکنش را می توان به شرح زیر نشان داد.

آمونیاک تولید شده باعث قلیائی شدن محیط می گردد، بنابراین با استفاده از یک معرف

PH می توان قلیایی شدن محیط و در نتیجه تولید آمونیاک را نشان دهد. رایج ترین معرف

PH در این آزمایش فنل رد می باشد. فنل رد در ۶/۸ نارنجی و در PH ۸/۱ برنگ صورتی

سیر دیده می شود.

حساسیت آزمایش اوره آز را با استفاده از بافر می توان تنظیم کرد. با استفاده از یک محیط ساده بشدت با فر شده «استوارت» و همکارانش دریافتند که آزمایش اوره آز می تواند برای پروتئوس اختصاصی باشد «روستیجیان» و استوارت سپس با کاهش مقدار بافر محیط توانستند نشان دهند که یک آزمایش اوره آز مثبت اختصاصی برای Proteus را می توان در مدت ۲ تا ۴ ساعت بدست آورد. پروتئوس به طور مشخص مقادیر زیادتری اوره آز در مقایسه با باکتریهای دیگر تولید می کند و بنابراین آمونیاک تولید شده اضافی نمی تواند توسط بافر موجود در محیط خنثی گردد.

از آنجائیکه آگاهی از تولید اوره آز در باکتریهای دیگر به جز پروتئوس می تواند مفید باشد کریستنسن Christensen محیط دیگری برای نشان دادن مقادیر کم اوره آز ابداع کرد از مقدار بافر کاسته شد و پیتون و گلوکز به محیط افزوده گردد. تا رشد میکروارگانیسمها بهتر صورت گیرد، این تغییرات باعث شد تا حساسیت محیط اوره آز بسیار افزایش یابد. تعداد دیگری از روشها برای آزمایش اوره آز توصیف شده اند.

حساسیت این محیط ها بین محیط ارائه شده توسط روستیجیان و استوارت و محیط «کریستنسن» قرار دارد، این حساسیت در درجه نخست به تعداد بافر موجود در محیط کشت بستگی دارد و انتخاب هر یک از آنها بستگی به نظر آزمایش کننده دارد.

از آنجائیکه اساس کار در این روشها بر تغییر PH محیط به طرف استوار است این محیط ها برای اوره آز اختصاصی نیستند، اگر پیتون و یا ترکیبات پروتئینی دیگر محیط دارای مقادیر زیادی اسیدهای آمینه بازی باشند، در اثر هیدرولیز پروتئین ها محیط ممکن است قلیائی شود.

برخی از باکتریها مانند سود مونس آرچینوس ممکن است با شکستن پیتون، آمونیاک تولید نمایند که باعث خواهد شد تا پاسخ آزمایش به طور دروغین (+) شود در این موارد لازم است که از باکتری مورد آزمایش در همان محیط ولی بدون اوره کشت داده شود و پس از پایان گرمخانه گذاری به عنوان شاهد با لوله های دارای اوره مقایسه گردد.

VOGES – PROSKAUER (VP) TEST

آزمایش وژپرسکوئر
آزمایش وژپرسکوئر در شناسائی باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه ها به کار می رود، باکتریهای این خانواده قادر به تخمیر گلوکز می باشند، به طور کلی دو راه برای تخمیر گلوکز در انتروباکتریاسه ها وجود دارد. یکی «تخمیر اسیدی مخلوط» (Mixed acid fermentation) که در آن مقدار زیادی اسید فرمیک، اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید سوکسینیک و اتانول تولید می گردد و دیگری «تخمیر بوتیلن گلیکول» (Butylen glycol fermentation) که در آن مقدار ناچیزی از این اسیدها تولید می گردد ولی مقادیر زیادی بوتیلن گلیکول و اتانول بوجود می آید، «استیل متیل کاربیتول» یا «استوئین» ماده حد واسطی است که برای بوتیلن گلیکول تشکیل می گردد. از آنجائیکه در آزمایش وژپرسکوئر تولید استوئین جستجو می شود، مثبت بودن آزمایش VP تأیید وجود تخمیر از راه تولید بوتیلن گلیکول می باشد.

در سال ۱۸۹۸ «وژ» و «پرسکوئر» واکنش رنگینی را توصیف کردند. که آنرا در شناسائی باکتریهای روده ای مفید تشخیص دادند. در مورد باکتریهای جنس *Enterobacter* و *Klebisella* واکنش مثبت و در مورد *Escherichia Coli* واکنش منفی بود. این پژوهشگران باکتریها را در یک محیط قنددار کشت داده و پس از پایان گرمخانه گذاری پتاس

به محیط کشت افزودند، آنگاه لوله ها را برای مدت ۲۴ ساعت یا بیشتر در دمای اتاق قرار دادند، پیش از این مدت در بعضی از لوله ها رنگ قرمز تولید گردید و «وژ» و «پرسکوثر» این لوله ها را مثبت نامیدند.

در سال ۱۹۰۶ «هاردن» (Harden) (۳) نشان داد که پیدایش رنگ قرمز در اثر وجود استیل متیل کاربیتول در محیط می باشد، در حضور پتاس و اکسیژن این ماده اکسید شده و به دی استیل تبدیل می گردد که با برخی از مواد موجود در محیط کشت ترکیب شده و رنگ قرمز تولید می کند دی استیل به تنهایی در حضور پتاس رنگ قرمز ایجاد نمی کند، بعدها معلوم شد که یک گروه آزاد NH_2 از باقیمانده گوانیدین مانند آنچه که در آرژینین موجود در پیتون وجود دارد برای پیدایش رنگ قرمز ضروری است.

«اومرا» (O'Mearo) در سال ۱۹۳۱ دریافت که افزودن کراتین به محیط کشت باعث افزایش تولید رنگ می گردد، زیرا کراتین مقدار بیشتری گروههای گوانیدین در دسترس قرار می دهد، با استفاده از کراتین رنگ قرمز در مدت ۱۵ دقیقه پدیدار می گردید.

در سال ۱۹۳۶ «باریت» (Barritt) با اضافه کردن آلفا - نفتول هنوز دقیقاً شناخته نشده است آنچه اهمیت دارد این است که آلفا نفتول به حساسیت آزمایش افزود. بدون وجود آلفا- نفتول حداقل مقدار قابل شناسائی دی استیل ppm بود. با افزودن آلفا- نفتول حساسیت آزمایش ۵۰ برابر افزایش یافت. نقش آلفا- نفتول پیش از KOH افزوده شود. «باریت» همچنین دریافت که Meat infusion broth نباید مورد استفاده قرار گیرد زیرا در عصاره گوشت، استوئین، دی استیل و ترکیبات وابسته وجود دارد که باعث ایجاد پاسخهای دروغین مثبت گردد، محیط کشت توصیه شده برای آزمایش VP به صورت تجارتي در دسترس قرار

دارد و محیط MR – VP (یا آبگوشت Clark - Lubs) خوانده می شود. این محیط دارای،
مقادیر مناسب گلوکز، پیتون و بافر می باشد.

در هنگام افزودن معرفها به محیط، ابتدا آلفا- نفتول سپس پتاس و کراتین اضافه می شود.

استوئین اکسیده شده و در مجاورت پتاس، اکسیژن به دی استیل تبدیل می گردد. دی استیل با

گروه گوآنیدین کراتین ترکیب شده و رنگ قرمز تولید می کند فرمول واکنش به شرح زیر می

باشد.

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

www.kandoo.cn.com

واکنشهای شیمیایی مرحله تولید رنگ شناخته نشده است.

توصیه شده است که مدت گرمخانه گذاری باید از ۴۸ ساعت کمتر نباشد ولی به هر حال روشهای سریعتری نیز در دسترس قرار دارند. این روشها به طور کلی شامل کشت مقدار زیادی از باکتری در مقدار کمی (۰/۳ تا ۰/۵ میلی لیتر) از محیط می باشد. پس از ۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه مقدار کافی استوئین تولید می گردد. اگر باکتری قبلاً دارای گلوکز است (مانند TSI و مک گانکی آگار) کشت داده شده باشد باکتری های استوئین مثبت قبلاً در این محیط ها مقدار کافی استوئین تولید کرده اند که در صورت افزودن معرف های VP بیرنگ رنگ قرمز پدیدار می شود.

در یک روش دیگر از نوارهای کاغذی آغشته به معرف استفاده شده است نتایج این دو روش سریع با نتایج حاصل از روش استاندارد ۴۸ ساعته یکسان است.

INDOLE TEST

آزمایش اندول

توانایی باکتری ها در تولید اندل مدتهاست که بخشی از آزمایشهایی را تشکیل داده و به منظور جدا کردن *Escherichia* از *Enterobacter Klebsiella* به کار می رود اگر چه امروزه این آزمایش در شناسایی تعداد زیادی از باکتریها مورد استفاده قرار می گیرد.

باکتری هایی که دارای آنزیم تریپتوفاناز هستند می توانند از اسید آمینه تریپتوفان اندل تولید نمایند، منبع تریپتوفان پپتونی است که در محیط کشت به کار رفته، اگرچه توصیه شده که بهتر است باکتریها در آبگوشت تریپتوفان کشت داده شوند که نسبت تریپتوفان آن بالاست. همچنین توصیه شده است محیط کشتی که برای آزمایش اندل به کار می رود فاقد گلوکز باشد زیرا وجود گلوکز ظاهراً مانع از تولید اندل می گردد. حضور اکسیژن نیز تولید اندل را تحت تأثیر

قرار می دهد. باکتری های هوازی اختیاری مانند E.Coli در شرایط هوازی اندل بیشتری تولید می کنند.

اندل تولید شده توسط میکروارگانیسم ها را می توان توسط چندین معرف مختلف شناسائی کرد، ولی واکنش شیمیایی اصلی در همه آنها یکسان است معرف ارلیخ- بوهمه (Erlich - Boehme) از دو جزء یعنی پارادی متیل آمینو بنزالدئید هیدروکلراید در الکل و پرسولفات پتاسیم تشکیل شده است.

هر معرف به طور جداگانه به محیط کشت افزوده می شود و در صورتیکه اندل تولید شده باشد رنگ قرمز پدید می آید. روش دیگر این است که به محیط کشت حلالی چون گزین اتر و یا کلروفرم افزوده می شود تا اندل را استخراج کرده و در سطح جمع کند. آنگاه معرف پارادی متیل آمینو بنزالدئید اضافه می گردد و در صورتیکه اندل وجود داشته باشد رنگ قرمز در سطح پدید می آید.

«کوواکس» (Kovacs) معرف «ارلیخ- بوهمه» را با جایگزین کردن آمیل الکل به جای الکل به جای الکل اتیلیک تغییر داد. برتری این معرف در این است که استخراج و متراکم کردن اندل با افزودن یک معرف انجام می گیرد.

معرف کوواکس امروزه بیش از سایر معرفها مورد مصرف قرار می گیرد.
«گید بوش» (Gadebusch) و «گابریل» (Gabriel) () گزارش کرده اند که جایگزین کردن آمیل الکل با ایزوآمیل الکل باعث پایداری بیشتر معرف کوواکس می گردد. بوتیل الکل نیز برای تهیه معرف کوواکس می تواند مورد مصرف قرار گیرد.

واکنش شیمیایی برای شناسایی وجود اندل بر این واقعیت استوار است که هنگامی که یک پیرول (اندل - بنزوپیرول) محلول اسید الکلی ضعیف پارادی متیل آمینو بنز آلدهید در حضور حرارت با هم مخلوط شوند، رنگ قرمز ارغوانی پدید می آید. در صورتی که برای ساختن معرف از اسید کلریدریک غلیظ استفاده شود به دادن حرارت نیاز نیست. واکنش به شرح زیر می باشد.

باید یاد آور شد که اگر چه در فرمول های قبل نشان داده نشد ، ممکن است آلفا متیل اندل (اندل استیک اسید) از تریپتوفان تشکیل گردد و این ماده نیز می تواند با معرف «الیک - بوهمه» و یا «کوواکس» ترکیب و برنگ قرمز تولید نماید. بنابراین آزمایش های یاد شده برای اندل اختصاصی نیستند. اختصاصی کردن آزمایش برای اندل می تواند باین صورت انجام گیرد که به جای افزودن معرف به محیط کشت، پنبه در پوش لوله را به معرف آغشته کرده و لوله را حرارت داد. چون اندل فرار بوده ولی آلفا متیل اندل فرار نیست، فقط در صورت وجود اندل پنبه درپوش فرمز رنگ می گردد.

«هولمن» (Holman) و «گونزالس» (Gonzales) معرف اسید اکزالیک «گنزا» (Gnezda) را برای جستجوی اندل که در ۳۷ درجه فرار است به کار بردند. در این آزمایش نواری از کاغذ صافی به اسید اکزالیک اشباع شده آغشته می گردد و نوار در بالای محیط کشت قرار می گیرد، به طوریکه با محیط کشت تماس نداشته باشد، با تبخیر اندل رنگ کاغذ صورتی می شود.

از آنجائیکه دو روش اخیر برای اندل اختصاصی هستند در صورت استفاده از این معرف ها تعداد پاسخهای مثبت کمتر از مواردی است که در آنها از معرفهای «ارلیخ-بوهمه» و یا «کوواکس» استفاده شده است.

«ایزنبرگ» (Isenberg) و «سادنهایم» (Sudenheim) اختصاصی بودن معرف پارادی متیل آمینو بنزالدئید را برای اندل مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که این معرف با ترکیب اندلی متفاوت پس از ۵ دقیقه رنگ قرمز تولید می کند، فقدان این ویژگی در صورتیکه معرف مستقیماً به محیط کشت افزوده شود، بیشتر خواهد بود، در حالیکه اگر اندل موجود در محیط ابتدا توسط تولوئن استخراج شده و سپس معرف به آن اضافه شود رنگ قرمز پس از ۵ دقیقه تنها در صورت وجود اندل و ۰- متیل اندل تشکیل خواهد گردید.

«ایزنبرگ» و «سادنهایم» همچنین استفاده از هیدروکسیلامین هیدروکلراید (Hydroxylamine hydrochloride) را به جای پارادی متیل-آمینوبنزالدئید مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که این معرف حتی پس از گذشت ۲۰ دقیقه تنها با اندل ۰- متیل اندل رنگ قرمز تولید می کند. واکنشهای شیمیایی بین اندل و هیدروکسیلامین هیدروکلراید هنوز شناخته نشده است.

بسیاری از پژوهشگران احساس می کنند که معرف اریخ حساستر از معرف کوواکس است. هنگامی که آزمایش اندل بر روی گروههای مختلف باکتری ها انجام می گیرد باید توجه داشت که همان روشی که در اصل برای شناسائی باکتریهای مورد آزمایش به کار رفته مورد استفاده قرار گیرد. بعنوان مثال در مورد باکتری های خانواده انتروباکتریاسه ها بنا به گزارش «اوینگ» و «دیویس» باید از معرف «کوواکس» استفاده کرد. در حالیکه در هنگام مطالعه باکتری های تخمیر ناکنده مانند *Flavobacterium* توصیه می شود که از معرف اریخ استفاده گردد. معرف اریخ همچنین برای شناسائی تولید اندل در میکروارگانسیم های بیهوازی توصیه می گردد. به طور معمول باکتری ها در آبگوشتی که دارای مقدار زیاد تریپتوفان است کشت داده می شوند و سپس محیط حداقل ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری می گردد. البته می توان بابر داشت مقدار زیادی از پرگنه باکتری از روی محیط جامد و کشت آن در مقدار کمی از آبگوشت تریپتوفان دار (۰/۳ تا ۰/۵ میلی لیتر) نتیجه را در مدت کوتاهتری به دست آورد. تریپتوفان نازی که قبلاً در باکتریهای کشت داده شده تولید شده است در مدت ۴ ساعت تریپتوفان را تجزیه می کنند و تولید اندل را می توان در این مدت تشخیص داد. نوارهای آغشته به معرف نیز که به طور تجارتي در دسترس قرار دارند به جز در مورد برخی از سویه های *Proteus rettgeri* و بیهوازی ها در سایر موارد نتایجی مشابه روشهای کلاسیک جستجوی اندل را دارند.

روش سریع دیگری نیز برای آزمایش تولید اندل پیشنهاد شده است.

در این روش تکه ای از کاغذ صافی که در یک پلیت قرار داده شده به معرف پارا- آمینو دی متیل بنزالدئید آغشته می گردد و سپس یک لوپ از میکرو ارگانسیم مورد آزمایش که در

محیط تریپتوفان دار رشد کرده است روی کاغذ صافی گذاشته می شود. تولید رنگ قرمز در
عرض چند ثانیه نشانه وجود اندل می باشد، با این روش برخی از سویه های *P. vulgaris*,
P. rettgeri Providencia, - Aolemonas نتایج منفی دروغین می دهند.

استفاده از سیترات CITRATE UTILIZATION :

توانایی عده ای از باکتریها در مصرف سیترات سدیم به عنوان تنها مبلغ کربن عمدتاً در
بازشناسی باکتریهای میله ای شکل گرم منفی به کار رفته است.
«هاپ- سیلر» (Hopper - Seyler) در سال ۱۸۷۹ (۱) نخستین پژوهشگری بود که اظهار
نظر کرد باکتریها می توانند نمکهای اسیدهای آلی را به کربناتهای قلیائی تبدیل کنند. کاربرد و
مطالعه بیشتر این کشف مهم تا سال ۱۹۱۵ دنبال نشد. در این سال «ایرز» (Ayers) و «راپ»
(Rupp) مشاهده کردند که تعدادی از باکتریها می توانند بدون پیتونیزه کردن شیر، آنرا قلیائی
کنند.

این پژوهشگران چنین پنداشتند که شکسته شدن نمکهای اسیدهای آلی موجود در شیر و
تبدیل آنها به کربنات ها باعث قلیائی شدن شیر می شود و گزارش کردند که تخمیر نمکهای
اسیدهای آلی در رده بندی باکتری ها دارای ارزش بسیار می باشد....

در طی سالهای بعد «ایرز» و «راپ» پژوهشهای خود را بر روی واکنشهای قلیائی برخی از
باکتریها متمرکز ساختند، توجیه این واکنشها با تولید آمونیاک و یا موادی که در اثر شکسته
شدن پروتئین ها بوجود می آیند امکان پذیر نبود. برای مطمئن شدن از اینکه این فرآورده های
قلیائی در اثر شکسته شدن پیتون پدید نیامده اند، آنها ازت لازم برای محیط کشت را توسط
فسفات امونیوم سدیم تأمین کردند و محیط عاری از پیتون بود. «ایرز» و «راپ» تأثیر گلوکز و

سیترات سدیم را هنگامی که به طور جداگانه و یا مخلوط در محیط به کار برده می شدند مورد ارزشیابی قرار دادند و چنین نتیجه گیری کردن که تخمیر اسیدی و قلیائی می تواند به طور همزمان و در اثر تخمیر قندها و یا نمکهای اسیدهای آلی صورت پذیرد و نسبت تخمیر گلوکز و سیترات به طور جداگانه در باکتریهای مختلف متفاوت است.

براون (Brown) استفاده از سیترات سدیم در محیط های کشت را مورد مطالعه بیشتر قرار داد و دریافت که این ترکیب رشد دسته ای از باکتریها را شتاب می بخشد در حالیکه از رشد عده ای دیگر از باکتریهای کاملاً جلوگیری می کند. او همچنین دریافت که سیترات افزوده شده به محیط مایع و یا جامد همان تأثیر را داراست.

«کوسر» (Koser) در سال ۱۹۳۳ محیط آبگوشتی پایه ای ساخت که در آن ازت توسط فسفات آمونیوم تأمین شده بود، وی با این محیط پایه اسید آلی را به طور جداگانه و با تراکم ۰/۲ درصد افزود و توانائی استفاده باکتری ها از هر یک از این اسیدهای آلی را مورد ارزشیابی قرار داد. مهمترین نتیجه ای که از این آزمایش بدست آمد این است که باکتریهای آئروژنر (Aerogenes) می توانستند سیترات را به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده قرار دهند. در حالیکه باکتریهای گروه کولی (Coli) قادر به رشد در این محیط نبودند. از آنجائیکه تشخیص رشد بر روی محیط جامد آسانتر از تشخیص رشد بر روی محیط جامد آسانتر از سنجش تیرگی آبگوشت بود، «سیمونز» (Simmons) به محیط «کوسر» آگار افزوده و آبی برموتیمول را نیز به عنوان معرف rH به آن اضافه کرد. این معرف در PH های بیش از ۷/۶

آبی است.

محیط دیگری که برای مطالعه استفاده سیترات توسط باکتریها ارائه گردید، محیط کشت «کریستینس» (Christensen) بود در این محیط ازت توسط «سیستین هیدروکلراید» (Systeine hydrochloride) تأمین شده بود و عصاره مخمر برای غنی کردن و «فنل رد» به عنوان معرف PH در محیط کشت وجود داشتند. این محیط از مواد غذایی سرشار است و برخی از باکتریها ممکن است در این محیط مثبت و در محیط «سیمونز» منفی باشد. استفاده از این نوارهای آغشته به سیترات نیز مورد توجه قرار گرفت ولی رابطه بین این نوارها و محیط «سیمونز» بسیار ضعیف است.

در سال ۱۹۴۷ لومینسکی Lominski و همکارانش نشان دادند که اگر چه *Escherichia coli* در محیط سیترات «کوسر» قادر به رشد نیست ولی یان باکتری در شرایط مناسب بویژه در صورت وجود گلوکز در محیط کشت، قادر به استفاده از سیترات می باشد. نظر این پژوهشگران بر این بود که رشد در محیط سیترات بوجود گیرنده های هیدورژنی مناسب در محیط کشت بستگی دارد. «داگلی» (Dagley) و «داوز» (Dawes) نشان دادند که سیترات توسط آنزیمی که از *Enterobacter aerogenes* استخراج شده بود اگزالواستات و استات تبدیل می شود و سپس در اثر دکربوکسیله شدن اگزالواستات پیرووات و انیدریدکربنیک تولید می گردد. آنها همچنین دریافتند که وجود این متیزیم برای فعالیت حداکثر آنزیم ضروری است، بنابراین نظر، باکتری ها یا دارای این آنزیم هستند و یا فاقد آن می باشند.

این نظر توسط «ویت» (Wheat) و «اجل» (Agl) رد شده آنها نشان دادند که سلولهای پاره شده *E. Coli* دارای آنزیمی هستند که قادر به شکستن سیترات می باشد. این پژوهشگران

همچنین توانستند نشان دهند که آنزیم شکننده سیترات در *E. Coli* یک آنزیم «سازشی» (Adaptive) بوده در حضور توأم گلوکز و سیترات مقادیر زیاد تولید می گردد.

پژوهشهای «اوبراین» (O'Brien) و «جیزلر» (Geisler)، نشان می دهد که در متابولیسم حتی بین گونه های یک جنس تفاوت هائی وجود دارد. به عنوان مثال فعالیت آنزیمی در *Enterobacter cloacae* بوجود یمن منیزیم نیازمند نیست و این حتی باعث تحریک فعالیت آنزیم نیز نمی گردد.

آنزیمی که واکنش شکسته شدن سیترات را کاتالیز می کند به نامهای گوناگونی خوانده شده است مانند:

Citrate aldolase و *Citridemolase* ، *lyase* ، *Citritase* ، *Citrise* نخستین

فرآورده های شکسته شدن سیترات، اگزالوآستات و استات هستند که سپس به پیرووات وایدیرید کربنیک تبدیل می گردند . واکنش ممکن است به یک یمن دو ظرفیتی فلزی مانند منگنز یا منیزیم نیازمند باشد یا نباشد از آنجائیکه *E.Coli* دارای آنزیم *Citrate lyase* می

باشد ولی نمی تواند در محیط «کوسر» یا «سیمونز» سیترات را به مصرف برساند. چنین به نظر می رسد که این باکتری فاقد سیستم انتقال دهنده یا «پرمئاز» *Permease* می باشد که نفوذ سیترات را بدرون سلول امکان پذیر می سازد. تولید آنزیم پرمئاز القاء پذیر می باشد.

چگونگی دقیق واکنشهای قلیائی باکتری هائی که سیترات را به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار می دهند هنوز هم بدرستی روشن نیست، اگرچه نمک آلومینیوم بعنوان منبع ازت در محیط مک آلومینیوم بعنوان منبع ازت در محیط وجود دارد ولی «کلارک» (Clarck) و «لبز» (Lubs) در سال ۱۹۱۷ نشان دادند که واکنش قلیائی مربوط به آزاد شدن آمونیاک نمی

باشد. بنابراین به نظر می رسد که واکنش قلیائی به علت تولید بیش از حد انیدرید کربنیک می باشد که ممکن است با سدیم و آب ترکیب شده و کربنات سدیم را بوجود آورد، کربنات سدیم قلیائی بوده و می تواند رنگ معرف آبی برومو تیمول را از سبز به آبی سیر تغییر دهد. این امکان نیز وجود دارد که ین سدیم باعامل هیدورکسیل آب موجود در محیط کشت ترکیب شده و هیدورکسید سدیم تولید کند.

هنگام انجام آزمایش سیترات باید توجه داشت که مقدار کمی از کشت میکروبی را از محیط قبلی برداشت کرده و به محیط سیترات انتقال داد زیرا در غیر این صورت ممکن است مقداری از ماده غذایی محیط قبلی به محیط سیترات را باید که در نتیجه آزمایش می تواند خلل وارد سازد، زمان گرمخانه گذاری بر حسب محیط کشت و روشی که برای گزارش کشت های منفی به کار می رود از ۴ ساعت برای نوارهای آغشته به سیترات و ۴-۷ روز برای محیط سیمونز متغیر است کشت های مثبت مورد تردید باید دوباره به محیط تازه سیترات انتقال یابند هنگامی که محیط سیترات دارای معرف PH به کار برده می شود تنها کشت هایی مثبت گزارش می شوند که باعث تغییر رنگ به طرف قلیائی شده باشد.

مطالعات باکتریالژیکی:

از سوشهای کشت داده شده بر روی ژلوزیه وسیله سرم فیزیولوژی (نرمال سالین) به مقدار CC ۵ سوسپانسیون تهیه نموده و بدین طریق که سرم را در لوله حاوی کشت ریخته کاملاً مخلوط می نمایم تا سوسپانسیون یکنواخت به دست آید. بعداً بوسیله پیپت پاستور که در انتهای آن لاستیک مکنده وجود دارد از این سوسپانسیون برداشت نموده و در قایقکهای مخصوص سیستم (API) ریخته، البته با دقت کامل از اینکه حساب هوا در قایقک وجود نداشته باشد،

زیرا وجود هوا سطح تماس میکروب با هوا را بیشتر می نماید و نتیجه دلخواه را به دست نمی دهد و سپس در قایقکهای ADH و LDC و ODC و URE بعد از ریختن سوسپانسیون تا خط نشانه مقداری حدود ۵ قطره پارافین مایع ریخته تا سطح تماس میکروب را با هوا کاملاً به صفر برسانید و در قایقکهای VIP و CTI را کاملاً پر می نمایم، بوسیله سوسپانسیون، بدین علت میکروب سطح تماس بیشتری با هوا داشته باشد و بقیه قایقکها را تا لبه خط سوسپانسیون ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در اتو نگهداری می نمائیم.

اندازه گیری سرعت رشد و تکثیر میرابلیس و مرگانی مقام در مقایسه در محیط های اوره و Natient broth در حضور اوره و عدم حضور اوره.

روش کار:

بعد از تهیه محیط ژلوز در لوله آزمایش به طریقه Slant s سوشهای مورد مطالعه را با استفاده از یک لویی که سر آن کاملاً صاف شده بدرون محیط ژلوز فرو کرده و بعد به آرامی بر روی سطح مایل محیط می کشیم و به مدت ۲۴ ساعت در اتو 37°C قرار می دهیم، بعد از برداشتن کشتها از اتو به وسیله سرم فیزیولوژی محلول سوسپانسیون تهیه می نمایم بدین طریق که $2/0\text{CC}$ از سرم را در لوله محتوی محیط ژلوز و کشت رشد یافته می ریزیم و کاملاً مخلوط می نمایم. به طوریکه مایع کدر یا سفید رنگی که همان مخلوط سرم و میکروب است به دست آید و گام بعدی:

۱- تهیه محیط اوره و یا استفاده از اوره آماده و استریل که $2/5\text{ ml}$ یا 2 ml اوره را در لوله ریخته و بعد یک لوپ از سوسپانسیون تهیه شده از هر نمونه را در اوره تهیه شده تزریق می نمائیم، بعد از تزریق فوراً در اسکپر - فتومر قرار داده و OD آنرا اندازه گیری می

نماییم و بعد هر نیم ساعت تکرار می کنیم تا حدوداً ۶ ساعت ادامه می دهیم و نتایج به دست آمده را یادداشت می کنیم. لوله شاهد در این قسمت اوره می باشد.

۲- تهیه محیط (Nutrient broth):

بعد از تهیه محیط به وسیله یک لوپ که سر آن را کاملاً گرد و حلقه ای شده باشد از محلول های سوسپانسیون تهیه شده هر نمونه در آن تزریق نموده و بلافاصله بعد از تزریق در اسپکترومتر قرار داده و OD یادداشت می شود و بعد نیم ساعت به نیم ساعت همین عمل تکرار می شود و تا حدود ۳ ساعت و نتایج یادداشت می گردد. لوله شاهد در این مرحله Nutrient broth است.

۳- اندازه گیری میزان رشد میرابلیس و مرگانی در محیط . n . b در حضور اوره بعد از قرار دادن محیط آلوده به مرگانی و میرابلیس به مدت ۳ ساعت در اتو ۳۷C به هر کدام باندازه مساوی به مقدار ۲/۵CC اوره اضافه می نمائیم و هر کدام را تک تک در اسپکترومتر قرار داده و TOD آنها را می خوانیم تا حدود ۶ تا نیم ساعت تکرار می نمایم و نتیجه بدست آمده را یادداشت می نموده ایم.

قاپک شماره ۱	- سفید	+ زرد
قاپک شماره ۲	- نارنجی	+ قرمز ارغوانی
قاپک شماره ۳	- نارنجی	+ قرمز ارغوانی
قاپک شماره ۴	- نارنجی	+ قرمز ارغوانی
قاپک شماره ۵	- سبز	+ آبی
قاپک شماره ۶	- بیرنگ	+ سیاه
قاپک شماره ۷	- زرد	+ ارغوانی
قاپک شماره ۸	- زرد	+ قهوه ای
قاپک شماره ۹	- سفید	+ هاله ارغوانی
قاپک شماره ۱۰	- سفید	+ ارغوانی

در قاپکی شماره ۱۰

پس از ۲۴ ساعت ماندن در اتو دو معرف KOH یک قطره و همچنین یک قطره معرف آلفا نفتول اضافه می کنیم که رنگ ارغوانی می دهد.

نتایج مرحله شماره ۱:

مشخصات کلنی ها روی محیط های SS و Mc Conkey

اندازه	رنگ	لبه کلنی	اندازه	رنگ	لبه کلنی
۱۰۱/۱	رشد نکرده				
متوسط ۱/۵ میلیمتر ۱۲۰/۲	صورتی کم رنگ بیرنگ	صاف	۲ تا ۳ میلیمتر	زرد کم رنگ بادانه سیاه و بعضی بدون دانه	صاف
بزرگ ۳ میلیمتر ۳/P.M	بیرنگ	صاف	متوسط و درشت ۲ تا ۳ میلیمتر	زرد کم رنگ	صاف
متوسط ۱/۵ میلیمتر ۱۳۹/۱	بیرنگ	صاف	متوسط ۲ میلیمتر	بیرنگ	صاف
متوسط ۱۲۵/۱	بیرنگ	صاف	ریز ۰/۵ میلیمتر	بیرنگ	صاف
متوسط ۱-۱۲۷	بیرنگ	صاف	متوسط ۲ میلیمتر	بیرنگ	صاف

نتایج مرحله شماره ۲

نتیجه گیری از کشت سوشها بر روی محیط TST آگار

شماره سوشها

۱۲۵/۱	A / A محیط زردرنگ	محیط را اسیدی تر نموده با استفاده از تخمیر قند
۳/P.M	A/ SH _۲ محیط زردرنگ همواره سیاهی ته لوله	
۱۲۷/۱	A / A - G زردرنگ همراه با گاز	
کلنی صورتی ۱۲۰/۲	A/ SH _۲ - G محیط اسیدی همراه با رنگ سیاه ته لوله	
کلنی بیرنگ ۱۲۰/۲	A/ SH _۲ - G محیط قلیائی (قرمز) سیاه در ته لوله همراه با گاز	

رنگ سیاه ته لوله به علت این می باشد که میکرب با استفاده از هستیدین محیط تولید SH_۲

نموده و با Iron محیط ترکیب شده و تولید رنگ سیاه می نماید.

نتایج آزمایش رشد باکتری در محیط اوره:

شرایط: با طول موج اسپکتروفتومتر ۵۹۲ اتو در فشار ۱۵۰، ۱۱۲ °C

بعد از تزریق به کمک لوب از سوسپانسیون تهیه شده از سوش کشت داده شده بر روی

ژلوزوسرم فیزیولوژی نرمال بلافاصله در اسپکت قرار داده و OD آنرا مشاهده می نمائیم و

بعد نیم ساعت به نیم ساعت کنترل شده که ارقام بدست آمده از این قرارند.

زمان	بلافاصله	نیم ساعت	۱/	۱/۵	۲	۲/۵	۳
پراتئوس میرابلیس	۰/۱	۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۷	۰/۷۱	۰/۷۲
پرتئوس مرگانی	۰/۵	۰/۷	۰/۸	۰/۹	۰/۹۸	۰/۱۰	۰/۱۱
در مرحله بعدی به همین ترتیب اولی این دفعه تزریق در محیط نیترا ت برات می باشد که ارقام بدست آمده به شرح زیر می باشد.							
زمان	بلافاصله	نیم ساعت	۱/	۱/۵	۲	۲/۵	۳
پراتئوس میرابلیس	۰/۲/۵	۰/۳	۰/۴	۰/۴/۵	۰/۵	۰/۵/۵	۰/۵/۷
پرتئوس مرگانی	۰/۴/۵	۰/۶/۵	۰/۷/۵	۰/۸	۰/۸/۵	۰/۹	۰/۹/۱

در مرحله سوم بعد از تزریق سوسپانسیون در محیط نیترا ت برات به مدت ۳ ساعت در اتو

قرار داده و بعد از ۳ ساعت به محیط اوره اضافه می نمائیم که اعداد بدست آمده بدین قرارند:

زمان	بعد از سه ساعت	۳/۵ ساعت	۴	۴/۵	۵	۵/۵
پراتئوس میرابلیس	۰/۵/۵	۰/۱۰/۵	۰/۱۵/۵	۰/۱۶	۰/۱۸	۰/۱۵
پرتئوس مرگانی	۰/۹	۰/۱۳/۳	۰/۱۷	۰/۲۱/۵	۰/۲۲/۵	۰/۲۴/۵

بحث

همان طور که اشاره شد پروتئوس ها از خانواده آنتروباکتریاسه ها بوده و به همین دلیل محل اصل زندگی آنها در روده انسان است، گرچه وجود این باکتریها در روده انسان منجر به ایجاد اسهالهای حاد می شود، (به دلیل وجود پلاسمیدهایی که تولید کننده توکسین یا زهرا به های شبه LT و ST اشرشیائی)، با اینحال نقش این باکتریها در عفونتهای مجاری اداری بسیار مهم است، بررسی نتایج بسیاری از عفونتها در طی سالهای اخیر نشان داده است که پروتئوسهای ایزوله شده از مجاری اداری تحتانی و فوقانی عمدتاً منشاء روده ای دارند که خود میزان و خطر ابتلا به عفونتهای ناشی از آنها مخصوصاً در خانمها نشان می دهد. یکی از اختصاصات مهم این باکتری ها آنست که قادر به تشریح آنزیم اوره آز بوده و در محیطهای طبیعی مانند مئانه و سایر مجاری اداری قادر به تجزیه اوره و سایر اوراتها شده که نتیجه عمل آزاد شدن آمونیاک می باشد، این عمل باعث بالا رفتن PH محیط مئانه و سایر مجاری اداری شده و سلولهای این منطقه در PH های قلیائی آسیب دیده و فعالیت کمپلیمان ها متوقف می گردد ، که این عمل خود زمینه را برای ایجاد دستگاههای کلوی آماده می سازد.

مطالعات متعددی که در زمینه بررسی عامل ایولوژیک عفونتهای مجاری اداری در دنیا انجام گردیده است حاکی از آن است که پروتئوس ها رقم بسیار بزرگی در ایجاد این عفونتها تشکیل می دهند. این مطالعات همچنین نشان دهنده آن است که ۹۸/۵ درصد از پروتئوسهای ایزوله شده از این عفونتها پروتئوس میرابلیس می باشد و سایر پروتئوس ها و مخصوصاً پروتئوس مورگانی فقط در ۱/۵ درصد موارد از عفونتهای مجاری اداری جدا گردیده است. این اختلاف زیاد در کلونیزه کردن مجاری اداری امر غیر عادی تلقی می شود. در این مطالعه سعی

گردیده تا عوارض متعددی که می توانند بنوعی در این امر نقش داشته باشند مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه گیری کدورت لوله های محیط غذایی (بدون حاوی اوره) اوره به وسیله دستگاه

اسپکتروفترومتر به عنوان شاخص رشد هر یک از باکتریها در نظر گرفته شده و با توجه به این

امر در این آزمایشات مشخص گردید که پروتئوس میرابلیس خیلی سریعتر از پروتئوس

مورگانی در محیط غذایی حاوی اوره رشد می کند به طوریکه نه تنها میزان کدورت لوله که

نماینده رشد است در اولی خیلی سریعتر بالا می رود بلکه آزاد شدن آمونیاک ناشی از

تجزیه روده باعث قلیائی شدن محیط می شود که با اندازه گیری PH محیط می توان آنرا

مشخص نمود. با توجه به اینکه میزان باکتریهای تلقیح شده (اینوکولوم) در هر دو لوله آزمایش

مساوی بوده است و این افزایش سریع در میزان رشد را باید صرفاً به زمان تقسیم باکتری

مربوط دانست. این زمان تقسیم در پروتئوس میرابلیس و در حضور اوره به مراتب سریع تر از

پروتئوس مورگانی بوده و تا حدود نصف تقلیل پیدا می کند، این زمان تکثیر کوتاهی نه تنها به

باکتری این امکان را می دهد که از نظر رشد حائز تعداد بیشتری در محیط عمل باشد بلکه

باعث بالا رفتن سریع PH محیط و قلیائی شدن آن می شود که ناشی از شکسته شدن اوره

موجود در محیط است. تعداد زیاد باکتری در محیط نیز به عنوان یک فاکتور رقابتی در مقابل

سایر باکتریهای موجود در محل محسوب شده و این شانس را به باکتری می دهد که بسایر

میکروارگانیسم های محیط امکان رشد ندهد در حالیکه در محیط آبگوشت غذایی بدون اوره

این سرعت تکثیر آنچنان محسوس نمی باشد، نتیجه بررسی رشد این دو باکتری در محیط

های غذایی فاقد اوره اختلاف چندانی از نظر افزایش رشد را در این دو باکتری نشان ندهد و

به همین ترتیب اختلاف و به همین ترتیب اختلاف چندانی در PH محیط باکتری ها دیده نشد که مؤید این نظر می باشد که اصولاً رشد و تکثیر پرتئوس از میرابلیس تا حد زیادی بستگی به وجود اوره دارد. با توجه به این فرضیه آزمایش دیگری پس از آنکه هر دو باکتری را در محیط فاقد اوره رشد دادیم و زمان تکثیر و رشد آنها را اندازه گیری نمودیم در یک مرحله زمانی مشخص مقدار مشخصی اوره به هر دو محیط افزودیم، نتیجه این افزودن اوره باعث گردید تا پرتئوس میرابلیس که تا این لحظه فرآیند رشدی مشابه با پرتئوس مورگانی از خود نشان می دهد بلافاصله طرح رشدی بسیار سریع پیدا کرده و میزان و تعداد آن در زمان مشخص و در محیط به مراتب بیشتر از پرتئوس مورگانی شود این مسئله نشان دهنده آن است که پرتئوس میرابلیس در محیط های فاقد اوره قدرت ترشح آنزیم اوره آز را به آن صورتی که پرتئوس مورگانی دارد از خود نشان نداده و فقط این توانایی در هنگام برخورد و مجاورت با اوره صورت می گیرد. تحت این شرایط پتانسیل تولید و ترشح آنزیم اوره آز به سرعت و مقدار بسیار زیادی فعال شده و در نتیجه آزاد شدن آن اوره موجود در محیط شکسته و ضمن آزاد شدن آمونیاک PH محیط با سرعت بالا می رود ورود ادرار به مثانه به صورت یک حرکت دائم و خروج آن در زمانهای مشخص به صورت متوالی صورت می گیرد. که این خود یک سیستم کشت پیوسته و در شرایطی نیمه پیوسته را به وجود می آورد. تحت این شرایط وجود یک میکروارگانیسم با زمان تقسیم سریع این امکان را به باکتری خواهد داد که قبل از شسته شدن توسط سیستم پیوسته ادراری افزایش یافته و به تعداد قابل ملاحظه ای برای بوجود آوردن شرایط قلیایی ناشی از تجزیه اوره در مثانه برسد. تحت این شرایط شانس بقا برای آن

دسته از میکروارگانیسم هائیکه دارای زمان تقسیم طولانی تر هستند کمتر بوده و در نتیجه درصد ایجاد عفونت توسط این باکتری ها به حداقل تقلیل پیدا می کند.

منابع و مأخذ:

۱- کلینیکال باکترولوژی (باکتری شناسی بالینی) تألیف و ترجمه: محمدرضا یزدان پناه

گروه پاتوبیولوژی مجتمع علوم

پیرازشکی.

تألیف: فیروزه فیروزی

۲- میکروب شناسی عملی

ترجمه و تنظیم: محمد رضا یزدان پناه

۳- باکتریولوژی

مربی گروه پاتوبیولوژی.

۴- اصول آزمایش های بیوشیمیایی

دکتر بزرگمهر وزیری.

در

میکروب شناسی تشخیصی

تألیف دکتر منوچهر شهامت - دکتر

۵- میکروبیولوژی عمومی

فریدون ملک زاده.

دکتر حسن برادران، دکتر محمدناظم

۶- باکتری و ایمنی شناسی.

هاریسون

۶- طب داخلی هاریسون

بیماری های عفونی سیستم ادراری