بسم الله الرحمن الرحیم

روش‌های آزمایشگاهی برای جداسازی و شناسایی شیگلا، سالمونلا و اشریشیا کلی‌های پاتوژن از کشت مدفوع

(ویرایش اول)

دکتر محمد آهنگرزاده رضایی

عضو هیأت علمی گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی تبریز

پائیز ۱۳۹۰

مقدمه

اعضای خانواده انتروباکتریاسه گروه بزرگ و متنوعی از باسیل‌های گرم منفی هستند که جایگاه طبیعی آنها روده انسان یا حیوانات است. در این خانواده حدود ۴۰ جنس مختلف وجود دارند که مهمترین آنها عبارتند از اشریشیا، شیگلا، سالمونلا، یرسینیا، انتروباکتر، کلبسیلا، سیتروباکتر، سراشیا، پروتئوس، مورگانلا، پرووویدنسیا، ادواردسیلا، آریزونا و هافنیا. اغلب این باکتری‌ها فلور نرمال روده انسان بوده و در دستگاه گوارش بیماری‌زا نمی‌باشند. البته دو جنس سالمونلا، شیگلا و برخی از سویه‌های جنس اشریشیا کلی بصورت فلور طبیعی وجود نداشته و همیشه بعنوان پاتوژن اصلی شناخته می‌شوند. در ادامه به اختصار خصوصیات و ویژگی‌های اپیدمیولوژیک این باکتری‌ها بیان می‌شود.

شیگلا

باسیل گرم منفی، بی‌حرکت و عامل بیماری شیگلوزیس (Shigellosis) است که با حضور مقادیر فراوانی خون و چرک در نمونهٔ مدفوع مشخص می‌گردد. این جنس دارای چهار گونه است که مجموعاً ۳۹ سروتایپ و ساب تایپ را شامل می‌شوند. گروه A (شیگلا دیسانتریه)، گروه B (شیگلا فلکسنری) و گروه C (شیگلا بوئیدی) هر کدام دارای چندین سروتایپ ولی گروه D (شیگلا سونئی) فقط شامل یک سروتایپ می‌باشد. شیگلا *sonnei* و شیگلا *flexneri* به ترتیب شایع‌ترین عوامل ایجادکننده شیگلوزیس در کشورهای صنعتی و کشورهای در حال توسعه هستند. شدیدترین فرم بیماری (دیسانتری باکتریایی) توسط گونه شیگلا دیسانتریه ایجاد می‌شود. انسان تنها مخزن باکتری شیگلا است. بیماری از فردی به فرد دیگر غالباً از طریق مدفوعی-خوراکی (غذا یا دست آلوده به مدفوع، مگس یا سایر حشرات) انتقال می‌یابد. بیماری در سراسر جهان و در تمامی فصول دیده میشود. با توجه به پایین بودن دوز عفونی باکتری (۲۰۰-۱۰۰ عدد) بیماری به شدت مسری بوده و سریعاً گسترش می‌یابد. افراد در معرض خطر غالباً شامل کودکانِ زیر ۱۰ سال، اطفال ساکن مهدکودک‌ها و والدین آنها، جمعیت‌های نظامی و مردان همجنس باز هستند. عفونت‌های شیگلا تقریباً محدود به دستگاه گوارش بوده و تهاجم باکتری به خون (باکتریمی، سپتی‌سمی) بسیار نادر است. کلونیزاسیون بدون علامت، ممکن است در کولون تعداد اندکی از بیماران وجود داشته باشد (ناقلین مزمن) که بعنوان مخزن عفونت شیگلا مطرح هستند.

سالمونلا

باسیل گرم منفی، متحرک، لاکتوز منفی ، H_2S مثبت و عامل بیماری سالمونلوزیس (Salmonellosis) است که هم در انسان و هم در حیوانات ایجاد عفونت می‌کند. این باکتری می‌تواند در انسان بیماری‌هایی نظیر گاستروانتریت، تب تیفوئید (حصبه) و باکتریمی ایجاد کند. سالمونلاها براساس آنتی‌ژن‌های (O و H) به بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ مختلف طبقه‌بندی می‌شوند که چهار سروتیپ آنها به لحاظ بالینی مهم‌تر از بقیه بوده و موجب بیماری در انسان می‌شوند:

سروتیپ A (سالمونلا پاراتیفی A)

سروتیپ B (که سابقاً سالمونلا پاراتیفی B و امروزه سالمونلا شوت‌مولری نامیده می‌شود)

سروتیپ C (که سابقاً سالمونلا پاراتیفی C و سالمونلا کلراسوئیس و امروزه سالمونلا هیرشفیلدی نامیده می‌شود)

سروتیپ D (که سالمونلا تیفی در این گروه قرار دارد).

اغلب سالمونلاها ترجیحاً بیماریزای حیوانی هستند که مخزنی را برای عفونت انسانی فراهم می‌کنند. اما تنها مخزن سالمونلا تیفی انسان است. این باکتری‌ها در بدن حیوانات متعددی مثل ماکیان، خوک، گاو، جوندگان، خزندگان (لاک‌پشت، مار) و پرندگان (طوطی) وجود دارند. باکتری غالباً در اطفال بطور مستقیم از طریق مدفوعی-دهانی و در بقیه موارد از راه غذاها یا نوشیدنی‌های آلوده (بخصوص تخم‌مرغ و گوشت ماکیان) وارد بدن انسان می‌شود. دوز عفونی سالمونلا برای بروز بیماری (10^5-10^8) و در مورد *S. typhi* حدود 10^3 است. بیماری اغلب در بچه‌های 5> سال و افراد 60> سال و عمدتاً در طی تابستان و پاییز رخ میدهد.

اشریشیا کلی‌های پاتوژن:

جنس اشریشیا فراوان‌ترین ارگانیسم بی‌هوازی اختیاری موجود در کولون و مدفوع است و شامل ۵ گونه می‌باشد که اشریشیاکلی (*E. coli*) شایع‌ترین و با اهمیت‌ترین گونه از لحاظ بالینی است. با وجود این‌که گونه یاد شده اصولاً جزو فلور طبیعی و غیربیماری‌زای روده انسان بشمار می‌رود اما برخی از سویه‌های *E. coli* با دریافت ژن‌های ویرولانس خاص به سویه‌های ذاتاً پاتوژن تبدیل شده و انواع مختلفی از گاستروانتریت‌ها را ایجاد می‌کنند. این سویه‌های بیماری‌زا که به پاتوتایپ‌های اشریشیا کلی معروفند بر اساس فاکتورهای ویرولانس، مکانیسم بیماریزایی و جنبه‌های بالینی به شش گروه

تقسیم می‌شوند که عبارتند از: انتروپاتوژنیک اشریشیا کلی (EPEC)، انتروتوکسیژنیک اشریشیا کلی (ETEC)، انتروهموراژیک اشریشیا کلی (EHEC)، انتروایتوویزیو اشریشیا کلی (EIEC)، انترواگریگیتیو اشریشیا کلی (EAEC) و اشریشیا کلی چسبنده بصورت منتشر (DAEC).

اشریشیا کلی انتروپاتوژن (EPEC) عامل اصلی اسهال نوزادان بویژه در کشورهای درحال توسعه است. اشریشیا کلی انتروتوکسیژنیک (ETEC) از شایع‌ترین علل اسهال‌های مسافرتی و اسهال نوزادان در کشورهای جهان سوم و فقیر است. اشریشیا کلی انتروهموراژیک (EHEC) که به سویه وروتوکسیژنیک (VTEC) یا Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) نیز معروف است شایع‌ترین سویه اشریشیا کلی پاتوژن است که در کشورهای توسعه یافته ایجاد گاستروانتریت می‌کند. هر چند سروتیپ‌های مختلفی از EHEC وجود دارند اما سروتیپ O157:H7 شایع‌ترین سویه این باکتری است که از موارد بالینی جدا می‌شود. دوز عفونی این باکتری پایین بوده و مصرف کمتر از ۱۰۰ باسیل EHEC می‌تواند ایجاد بیماری کند. از سوی دیگر این باکتری در ۳۰-۵٪ بیماران (بویژه کودکان) علاوه بر ایجاد کولیت خونریزی دهنده ممکن است حدود یک هفته پس از اسهال، موجب سندرم اورمیک همولیتیک (HUS) و نارسایی کلیوی شود. این سندرم با آنمی همولیتیک میکروآنژیوپاتیک و کاهش پلاکت (ترومبوسیتوپنی) همراه است.

سویه‌های انتروایتوویزیو اشریشیا کلی به لحاظ فنوتیپی و پاتوژنیکی به باکتری *Shigella* شباهت زیادی داشته (غالباً لاکتوز منفی و غیرمتحرک) و بیماری بسیار مشابهی با شیگلوز ایجاد می‌کنند. شیوع بیماری آنها عمدتاً در کودکان کشورهای جهان سوم و یا مسافران به این مناطق دیده می‌شود. سویه‌های انترواگریگیتیو هم یکی دیگر از عوامل اسهال آبکی حاد و مزمن (بیش از ۱۴ روز) در کشورهای فقیر و کشورهای صنعتی بشمار می‌روند.

جمع‌آوری و انتقال نمونه‌های مدفوع

۱- جمع‌آوری نمونه:

نمونه‌گیری مدفوع باید در مراحل اولیه بیماری‌های روده‌ای انجام شود. بهتر است این کار حداکثر ظرف ۲ تا ۳ روز اول که عامل بیماری‌زا به تعداد بیشتری در مدفوع وجود دارد و قبل از شروع درمان آنتی‌بیوتیکی انجام شود. ضمناً نمونه باید صبح از بیمار گرفته شود تا بموقع در اختیار آزمایشگاه قرار گیرد و همان روز بررسی شود. میزان نمونه مورد نیاز در صورت قوام‌دار بودن حدود ۲-۱ گرم و در صورت آبکی بودن معادل ۵ سی‌سی می‌باشد. در صورتیکه ظرف نمونه‌برداری در اختیار بیمار یا

بخش گذاشته می‌شود باید به فرد نمونه‌گیر تأکید شود که ترجیحاً در صورت وجود، از بخش‌های خونی، موکوسی یا چرکی مدفوع نمونه‌گیری و ارسال گردد. در صورت نمونه‌برداری با سوآب، حداقل دو نمونه رکتال سوآب یا سوآب از مدفوع تازه برای هر بیمار باید جمع‌آوری و در محیط انتقالی تلقیح شود.

در برخی شرایط سوآب کاربرد بیشتری دارد. به‌عنوان مثال، اگر سریعاً به نمونه مدفوع نیاز باشد ولی انتقال سریع نمونه به آزمایشگاه با مشکلی همراه گردد، می‌توان سوآب از مدفوع را تهیه و به سرعت به آزمایشگاه انتقال داد. از سوی دیگر، رکتال سوآب برای نمونه‌برداری پاتوژن‌هایی مانند شیگلا مناسب‌تر است. البته در این‌گونه نمونه‌برداری‌ها، انجام صحیح روش نمونه‌گیری با سوآب بسیار مهم است.

الف) نمونه مدفوع:

نمونه مدفوع باید در ظرف پلاستیکی تمیز (نیاز به استریل بودن نیست)، دهان گشاد با درپوش محکم و فاقد نشتی جمع‌آوری شود. این ظرف باید عاری از مواد نگهدارنده، شوینده، یونهای فلزی یا کاغذ توالت باشد. نمونه مدفوع نباید با ادرار بیمار آلوده شود. این نمونه باید تازه گرفته شده باشد و در مدت ۳۰ دقیقه (به خصوص برای جداسازی شیگلا که بسیار حساس است) و حداکثر ۲ ساعت بعد از نمونه‌گیری کشت داده شود. نمونه‌هایی را که نمی‌توان به فاصله ۲ ساعت از نمونه‌گیری کشت داد، باید به محیط انتقالی منتقل کرد و بلافاصله در یخچال گذاشت. در این صورت نیاز به تهیه سوآب مدفوع می‌باشد.

ب) سوآب مدفوع:

برای قرار دادن نمونه مدفوع در محیط انتقالی، سوآبی را درون نمونه مدفوع که بیش از یک ساعت از جمع‌آوری آن نگذشته باشد قرار داده و پس از حرکت چرخشی، مقدار کمی از آن را بردارید. در صورت مشاهده موکوس در مدفوع باید با سوآب از آنها نیز نمونه گرفت. سوآب را تا عمق لوله محیط انتقالی وارد کنید و بخش اضافی بالایی چوب‌ها را بشکنید. در پیچ لوله را کاملاً ببندید. لوله را بلافاصله در یخچال قرار دهید. در صورت عدم دسترسی به یخچال آن را در مکانی خنک و دور از نور قرار دهید.

ج) رکتال سوآب:

در برخی بیماران (برای مثال در نوزادان و کودکان) امکان تهیه نمونه مدفوع یا سوآب مدفوع وجود ندارد. لذا تنها راه نمونه‌برداری، تهیه سوآب مقعدی یا رکتال سوآب است. دراین موارد، باید از سوآب پنبه‌ای سالم استفاده کنید و دقت نمایید که پنبه سر آن کامل باشد. برای نمونه‌برداری، ابتدا سوآب را با فرو کردن در محیط انتقالی استریل مرطوب کرده، سپس به اندازه ۴-۲/۵ سانتیمتر داخل اسفنگتر رکتوم فرو برید، سوآب را به آرامی بچرخانید تا با مخاط انتهایی رکتوم تماس یابد، سپس سواب را خارج کنید. با توجه به تغییر رنگ پنبه سر سوآب مطمئن شوید سوآب به مدفوع آغشته شده است.

بهتر است ۲ سوآب از بیمار گرفته شود و هر دو سوآب را در یک لوله حاوی محیط انتقالی قرار داد. ضمناً درصورت امکان باید محیط انتقالی یک ساعت قبل از استفاده در یخچال قرار داده شود تا سواب‌ها در محیط خنک قرار گیرند.

*** تذکر:**

برای افزایش شانس جداسازی باکتری‌ها (بویژه شیگلا و کمپیلوباکتر) از نمونه سواب مدفوع یا رکتال سوآب، محیط انتقالی حاوی سوآب‌ها باید در یخچال نگهداری شود. البته ترجیحاً نمونه باید تا ۲۴ ساعت پس از نمونه‌گیری کشت داده شود. محیط انتقالی حاوی رکتال سوآب یا سوآب مدفوع را می‌توان حداکثر تا ۳ روز در دمای یخچال نگهداری نمود. البته باستثناء این دو ارگانیسم، بیشتر عوامل پاتوژن می‌توانند برای مدت بیشتری (حداکثر یک هفته) در محیط انتقالی حتی در دمای محیط زنده بمانند. با اینحال، هنگامی که نمونه‌ها در محیط انتقالی قرار داده شده و نیاز به نگهداری آنها برای مدت بیشتری است، لازم است آنها را در فریزر (ترجیحاً در فریزر ۲۰°C- و یا در صورت عدم دسترسی در دمای ۱۵°C-) نگهداری کنید.

۲- محیط‌های انتقالی:

از محیط‌های انتقالی مورد استفاده برای ارسال سوآب مدفوع یا رکتال سوآب، کری-بلر، استوارت (Stuart)، ایمز (Amies) و BGS را می‌توان نام برد که در ادامه به دو مورد اشاره می‌شود:

الف- محیط انتقالی کری-بلر (Carry-Blair):

محیط انتقالی کری-بلر با pH=8.4 محیط مناسبی برای انتقال بسیاری از باکتری‌های پاتوژن روده‌ای از جمله شیگلا، سالمونلا، ویبریو کلرا، اشریشیا کلی O157:H7 ، یرسینیا انتروکولیتیکا و کمپیلوباکتر می‌باشد.

هنگام آماده کردن محیط کری-بلر، باید حجم محیط در داخل هر لوله به اندازه‌ای باشد، که حداقل ۴ سانتیمتر عمق داشته باشد. برای مثال در لوله‌های درپیچ دار ۱۳X۱۰۰ میلیمتر باید حجمی معادل ۶-۵ سی‌سی توزیع شود. این محیط را نباید استریل کرد بلکه باید در حالیکه درپیچ‌ها شل هستند، با بخار ۱۰۰ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه آنها را استریل کرد و پس از استریلیزاسیون درپیچ‌ها را محکم نمود. این لوله‌ها باید در ظروف کاملاً در بسته در مکانی خنک و دور از نور نگهداری گردد. محیط کری-بلر در صورت کاهش نیافتن حجم، عدم تغییر رنگ و آلودگی تا ۶ ماه قابل استفاده است.

ب- محیط انتقالی BGS:

محیط انتقالی مایعی است که برای انتقال نمونه‌های شیگلا، اشریشیاکلی و سالمونلا مناسب است. حتی به‌نظر می‌رسد که برای انتقال شیگلا، BGS از کری‌بلر مناسب‌تر باشد، به این شرط که حالت قلیایی محیط حفظ شده باشد؛ این مسئله نیز هنگامی مشخص می‌شود که رنگ محیط پس از افزودن مدفوع، صورتی باقی بماند. ضمناً توجه به این نکته ضروری است که محیط BGS برای ویبریو یا کمپیلوباکتر نامناسب‌است. مایع بودن و قابلیت مصرف آن تنها تا یک‌ماه پس از تهیه از معایب این محیط است.

*** تذکر:**

لازم به ذکر است در صورت عدم دسترسی به محیط‌های انتقالی، می‌توان سوآب مدفوع یا رکتال سوآب را در داخل لوله‌ای حاوی ۳۳ میلی مول بر لیتر گلیسرول-فسفات بافر قرار داده و ارسال کرد. ضمناً در موارد مشکوک به وبا می‌توان از لوله حاوی آب پپتونه قلیایی (alkaline peptone water) جهت ارسال نمونه و سوآب استفاده کرد.

۳- نگهداری و انتقال نمونه مدفوع:

پس از جمع‌آوری، نگهداری نمونه‌ها در یخچال ضروری‌است. اگر ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه در مدت ۲ روز پس از جمع‌آوری مقدور باشد، می‌توان آنها را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری کرد. در غالب موارد عوامل بیماری‌زا را حتی تا ۷ روز پس از جمع‌آوری می‌توان از نمونه‌های نگهداری شده در یخچال جدا کرد، البته میزان جداسازی پس از دو روز اول بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. اگر تحویل نمونه‌ها به آزمایشگاه در مدت ۲ روز ممکن نباشد، می‌توان آنها را منجمد

کرد، ولی این روش موجب کاهش تعداد باکتری‌ها و درنتیجه کاهش احتمال جداسازی عامل بیماری‌زا می‌شود. در این روش، نمونه‌ها را باید پس از جمع‌آوری به‌سرعت منجمد و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری کرد.

نمونه‌هایی که در یخچال نگهداری شده‌اند را باید در جعبه‌های عایق همراه با بسته‌های یخ به آزمایشگاه ارسال کرد. اگر از یخ مرطوب استفاده شود، لوله یا ظرف را باید در ظرف ضد آب همچون کیسه‌های پلاستیکی که بتوان در آنها را محکم بست قرار داد تا نمونه‌ها از آبی که از ذوب یخ تشکیل می‌شود، محافظت شود. شماره نمونه، نام بیمار و تاریخ نمونه‌گیری باید به صورت خوانا بر روی برچسب لوله نمونه نوشته شود. اطلاعات بیمار حتماً باید بر روی برگه درخواست درج شده و همراه با نمونه ارسال شود.

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه مدفوع

الف- بررسی ماکروسکوپی:

در آزمایشگاه، نمونه‌های مدفوع باید از نظر ظاهری بررسی شده و مواردی از قبیل رنگ مدفوع، وجود لخته خون، موکوس و قوام مدفوع ثبت و گزارش شوند.

ب- بررسی میکروسکوپی:

هرچند برخلاف سایر نمونه‌های بالینی، اغلب منابع عملی میکروب‌شناسی تهیه لام میکروسکوپی از نمونه مدفوع و بررسی آن را توصیه ننموده‌اند. با اینحال در برخی از موارد، با تهیه اسمیر نازک از مدفوع و رنگ‌آمیزی آن (متیلن‌بلو یا گرم) می‌توان وجود گلبولهای سفید، همچنین غالب بودن یک مورفولوژی باکتریایی، وجود سلولهای مخمر یا عدم وجود باسیل‌های گرم منفی روده‌ای را در مدفوع تعیین نمود. بدیهی است هر یک از این موارد می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای میکروب‌شناس و پزشک معالج جهت تشخیص عامل بیماری فراهم کند.

برای مثال، مشاهده توده‌هایی از پلی‌مورفونوکلئرها (>50 cells per high-power field)، ماکروفاژها و گلبول‌های قرمز غالباً نشان دهنده بیماری شیگلوز است.

در موارد سالمونلوزیس یا گاستروانتریت ناشی از اشریشیا کلی مهاجم (EIEC) و کمپیلوباکتر نیز سلول‌های پلی‌مورفونوکلئر البته با تعداد کمتر (<20 cells per high-power field) در لام مدفوع مشاهده می‌شوند.

در اسهال‌های خونی آمیبی اغلب سلول‌های (WBC, RBC) مشاهده شده در نمونه میکروسکوپی مدفوع حالت دژنره شده (ghost cells) دارند.

با اینحال در گاستروانتریت‌های ناشی از ویبریو کلرا ، اشریشیا کلی EPEC ، ETEC و اسهال‌های ویروسی تعداد لوکوسیت‌ها در مدفوع بیمار بسیار کمتر (۵-۲ سلول در هر میدان) خواهد بود.

❊ تذکر:

جهت بررسی نمونه مدفوع با متیلن‌بلو، ذره کوچکی از مدفوع (ترجیحاً ناحیه خونی یا موکوسی) بر روی لام با یک قطره از محلول متیلن‌بلو ۰/۰۵٪ بخوبی مخلوط شده و سپس یک لامل روی آن قرار داده می‌شود. پس از حدود ۳-۲ دقیقه انتظار می‌توان لام مرطوب را در زیر عدسی ۱۰۰ بررسی و نتایج را ثبت کرد.

انتخاب، تلقیح و انکوباسیون محیط‌های کشت مدفوع

الف) محیط‌های مورد استفاده برای کشت مدفوع:

۱- محیط‌های آگار افتراقی و انتخابی:

برای کشت روتین مدفوع، جهت جداسازی باکتری‌های بیماریزای روده‌ای اصولاً باید از محیط‌های افتراقی و انتخابی زیر استفاده شود: یک پلیت مک‌کانکی آگار (MacConkey Agar) که همه باسیل‌های گرم منفی روده‌ای بتوانند روی آن رشد کنند (MAC 1)، به‌همراه یک پلیت زایلوز-لیزین دکربوکسیلات آگار Xylose-Lysine Decarboxylate (XLD). البته می‌توان به جای XLD از محیط هکتون انتریک آگار Hektoen Enteric Agar (HE) نیز استفاده نمود (XLD 1, HE 1).

❊ تذکر:

۱) اگرچه محیط کشت Salmonella Shigella Agar (SS) نیز بطور سنتی برای کشت مدفوع بکار می‌رود، اما چون این محیط باعث مهار رشد برخی از گونه‌های شیگلا می‌شود لذا نباید در موارد مشکوک به شیگلوز، از آن به جای محیط مک‌کانکی آگار، XLD یا HE استفاده کرد.

۲) باتوجه به اینکه میزان مهارکنندگی محیط XLD کمتر از محیط HE است، لذا XLD برای جداسازی شیگلا مناسب‌تر از محیط HE می‌باشد.

۲- محیط‌های مایع غنی‌کننده:

رایج‌ترین محیط‌های مایع غنی‌کننده مورد استفاده در کشت مدفوع شامل SF براث (Selenite F broth) و GN براث (Gram Negative broth) می‌باشند. هرچند استفاده از این محیط‌ها به منظور بازیافت مقادیر کم پاتوژن در افراد بدون علامت ناقل (بویژه در میان کارکنان دارای مشاغل حساس مانند افراد شاغل در مهدهای کودک و آشپزخانه‌ها) الزامیست، اما غالباً اثر غنی‌کننده‌این محیط‌ها روی سالمونلا بیش از شیگلا دیده می‌شود. از دیگر محیط‌هایی که برای غنی‌سازی تعداد کم سالمونلا در نمونه مدفوع کارایی دارد، محیط تتراتیونات براث را می‌توان نام برد.

*** تذکر:**

۱) هرچند محیط SF براث برای غنی‌سازی و جداسازی سالمونلا مناسب است، ولی بر روی برخی از گونه‌های شیگلا دارای اثر مهارکنندگی است، لذا بهتر است در موارد مشکوک به شیگلوز از این محیط استفاده نشود. در این شرایط، استفاده از محیط GN براث بدلیل خاصیت مهارکنندگی کمتر برای گونه‌های سخت رشد شیگلا، ارجحیت دارد.

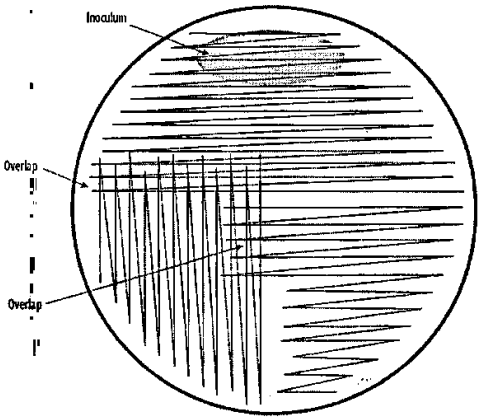
۲) هنگام ساخت محیط SF براث، حرارت دادن بیش از اندازه باعث ایجاد ذراتی در محیط می‌شود که در این صورت نمی‌توان از آن استفاده کرد. همچنین با توجه به این‌که عملکرد محیط SF براث در شرایط بی‌هوازی بهتر می‌باشد، بنابراین مقدار محیط در لوله باید به اندازه‌ای ریخته شود که حداقل عمقی معادل ۵ سانتی‌متر در آن ایجاد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

ب) تلقیح محیط‌های کشت و انکوباسیون:

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

۱- نحوه تلقیح محیط‌های آگار:

اگر نمونه بصورت سوآب ارسال شده باشد، ابتدا سوآب را بطور کامل در ناحیه (۱) به سطح پلیت مالیده، سپس نمونه را با لوپ استریل از منطقه تلقیح در کل پلیت بصورت خطی (Streak) کشت می‌دهیم، به طوری که کلنی‌های جدا از هم بدست آید (مطابق شکل زیر). در صورت ارسال نمونه مدفوع بیمار، می‌توان یک قطره از مدفوع آبکی و یا سوسپانسیون تهیه شده از مدفوع جامد در سرم فیزیولوژی را بعنوان مایع تلقیح استفاده کرد. پلیت‌های کشت مدفوع باید بمدت ۲۴-۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد قرار داده شود.



*** تذکر:**

- برای هر بیمار لازم است از یک پلیت ۱۰-۸ سانتیمتری استفاده نمود، زیرا در غیر اینصورت احتمال جداسازی کاهش می‌یابد.

- به هنگام کشت خطی بر روی محیط‌های با خاصیت انتخابی بالا (مانند XLD) در مقایسه با محیط‌های با خاصیت انتخابی کمتر (مانند مک‌کانگی)، باید تعداد بیشتری از خط‌های کشت هر منطقه با خطوط کشت منطقه قبلی در تماس (overlap) باشد، تا به این طریق شانس ایزولاسیون باکتری‌ها افزایش یابد.

۲- تلقیح محیط‌های مایع غنی‌کننده GN یا SF براث:

برای این منظور می‌توان سوآب رکتال یا سوآب مدفوع را پس از تلقیح محیط پلیت به داخل لوله حاوی محیط GN یا SF براث منتقل کرد. در صورتیکه نمونه مستقیم مدفوع در دسترس باشد مقداری از مدفوع را با لوپ به داخل محیط براث انتقال می‌دهیم. معمولاً برای محیط GN براث ۶-۴ ساعت انکوباسیون و برای محیط SF براث ۱۲-۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد توصیه می‌شود. البته در برخی منابع جدید برای انکوباسیون GN براث ۸-۶ ساعت و برای SF براث ۲۴-۱۸ نیز ذکر شده است (۶).

پس از این مدت، بدون مخلوط کردن، یک لوپ از سطح محیط براث برداشته (به دلیل حرکت بیشتر سالمونلاها در مقایسه با اشریشیا کلی و تراکم بالاتر آنها در سطح براث) و بر روی پلیت XLD و مک‌کانگی آگار بصورت خطی کشت می‌دهیم تا

کلنی‌های جدا از هم ایجاد شوند (XLD 2, MAC 2). همه پلیت‌ها دوباره بمدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری می‌شوند. در این مرحله می‌توان محیط‌های مایع غنی‌کننده را اوت کرد.

ج) جداسازی و تشخیص پاتوژن‌ها:

پس از هر مرحله کشت و انکوباسیون نمونه‌های مدفوع (MAC 1, XLD 1 یا MAC 2, XLD 2)، بایستی ضمن بررسی دقیق پلیت‌ها، میزان رشد، شکل و رنگ کلنی‌ها در هر یک از محیط‌های کشت داده شده به دقت ارزیابی و تفسیر گردد. به عبارت دیگر، هر چند آزمایش کشت مدفوع پس از دو مرحله (قبل از غنی‌سازی و بعد از غنی‌سازی) کامل می‌شود اما امکان دارد پاتوژن مدفوعی در همان پلیت‌های مرحله اول (قبل از غنی‌سازی) نیز جداسازی شود. لذا در هر مرحله از کشت مدفوع با کلنی‌های مشکوک مواجه شدیم بایستی پروسه تشخیص آن کلنی‌ها را نیز انجام دهیم.

مراحل تشخیص شیگلا

۱- خصوصیات کلنی شیگلا:

کلنی‌های شیگلا پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، بر روی محیط مک‌کانگی آگار برآمده بی‌رنگ یا همرنگ محیط با قطر ۳-۲ میلی‌متر، بر روی محیط HE سبز یا آبی مایل به سبز (سبزتر از کلنی‌های سالمونلا) بدون مرکز سیاه با قطر ۳-۲ میلی‌متر و بر روی محیط XLD صاف، قرمز یا صورتی بدون مرکز سیاه با قطر ۲-۱ میلی‌متر رشد می‌کنند. کلنی‌های شیگلا دیسانتری سروتایپ ۱ روی این محیط‌ها کوچک‌تر بوده و معمولاً روی محیط‌های با میزان مهارکنندگی کمتر مانند مک‌کانگی آگار بهتر رشد می‌کنند. البته کلنی آنها برخلاف سایر گونه‌های شیگلا روی محیط XLD خیلی ریزتر است.

۲- تشخیص بیوشیمیایی:

کلنی‌های مشکوک به شیگلا را باید به محیط‌هایی از قبیل Kligler Iron Agar (KIA) یا Triple Sugar Iron Agar (TSI) ، سیمون سیترات و SIM تلقیح کرده و ابتداً از نظر بیوشیمیایی و سپس از جهت سرولوژیک تأیید نمود.

لازم به ذکر است که جهت انجام تمامی تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی باید از یک نوع کلنی کاملاً ایزوله مشکوک شیگلا استفاده کرد. برای این منظور، می‌توان یک کلنی مشکوک را با آنس برداشته و سوسپانسیونی از آن در داخل سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل تهیه و برای انجام همه تست‌های بیوشیمیایی از آن استفاده کرد.

اگر کلنی کاملاً ایزوله روی محیط وجود ندارد، بهتر است از کلنی‌های مشکوک برداشته روی پلیت دیگری بصورت خطی Streak نمایید تا کلنی‌های خالص بدست آید و سپس از آنها برای تلقیح تست‌های بیوشیمیایی استفاده نمایید. در صورت عدم استفاده از کلنی خالص، واکنش‌های کاذب روی محیط TSI ، KIA یا سایر محیط‌های افتراقی ایجاد می‌شود.

برای تلقیح محیط‌های KIA یا TSI ابتدا آنس حاوی باکتری مشکوک را در عمق محیط (البته نباید آنس را کاملاً تا آخر فرو برد) وارد کرده و سپس سطح شیب‌دار را با آنس بصورت زیگزاگ تلقیح می‌کنیم. نحوه تلقیح محیط SIM فقط بصورت خنجری (stab) و در محیط سیمون سیترات صرفاً بصورت زیگزاگ روی سطح شیب‌دار خواهد بود.

همه محیط‌های بیوشیمیایی پس از تلقیح باکتری بمدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری پس از آن نتایج قرائت می‌گردد.

*** تذکر:**

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

۲) حجم محیط TSI و KIA در لوله باید به اندازه‌ای باشد که عمق و سطح شیبدار محیط هر یک حداقل ۳ باشند. سویه‌های شیگلا بر روی این دو محیط منظره Alk/Acid [سطح قلیایی (قرمز) و عمق اسیدی (زرد)] بدون H_2S ایجاد می‌کنند. البته برخی سویه‌های شیگلا فلکسنری ۶ و مواردا‌ستثنائی از شیگلا بوئیدی در این دو محیط می‌کنند. همچنین سویه‌های شیگلا سونئی لاکتوز را در انکوباسیون طولانی تخمیر می‌کنند.

علاوه بر بررسی تخمیر گلوکز و لاکتوز لازم است از دیگر تست‌های بیوشیمیایی مانند حرکت، اوره ، سیترات، دکربوکسیلاز (که همگی برای شیگلاها منفی هستند) نیز در شناسایی شیگلاها استفاده کرد.

باکتری‌هایی که با تست‌های فوق، واکنش‌های مشکوک به شیگلا را ایجاد می‌کنند، باید با روند ذکر شده در فلوچارت (۱) تعیین هویت شده و نهایتاً با آنتی‌سرم‌های ضد شیگلا تعیین سروگروه شوند. در صورت لزوم، این سویه‌ها باید برای تأیید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان یا آزمایشگاه مرجع کشوری نیز ارسال شوند.

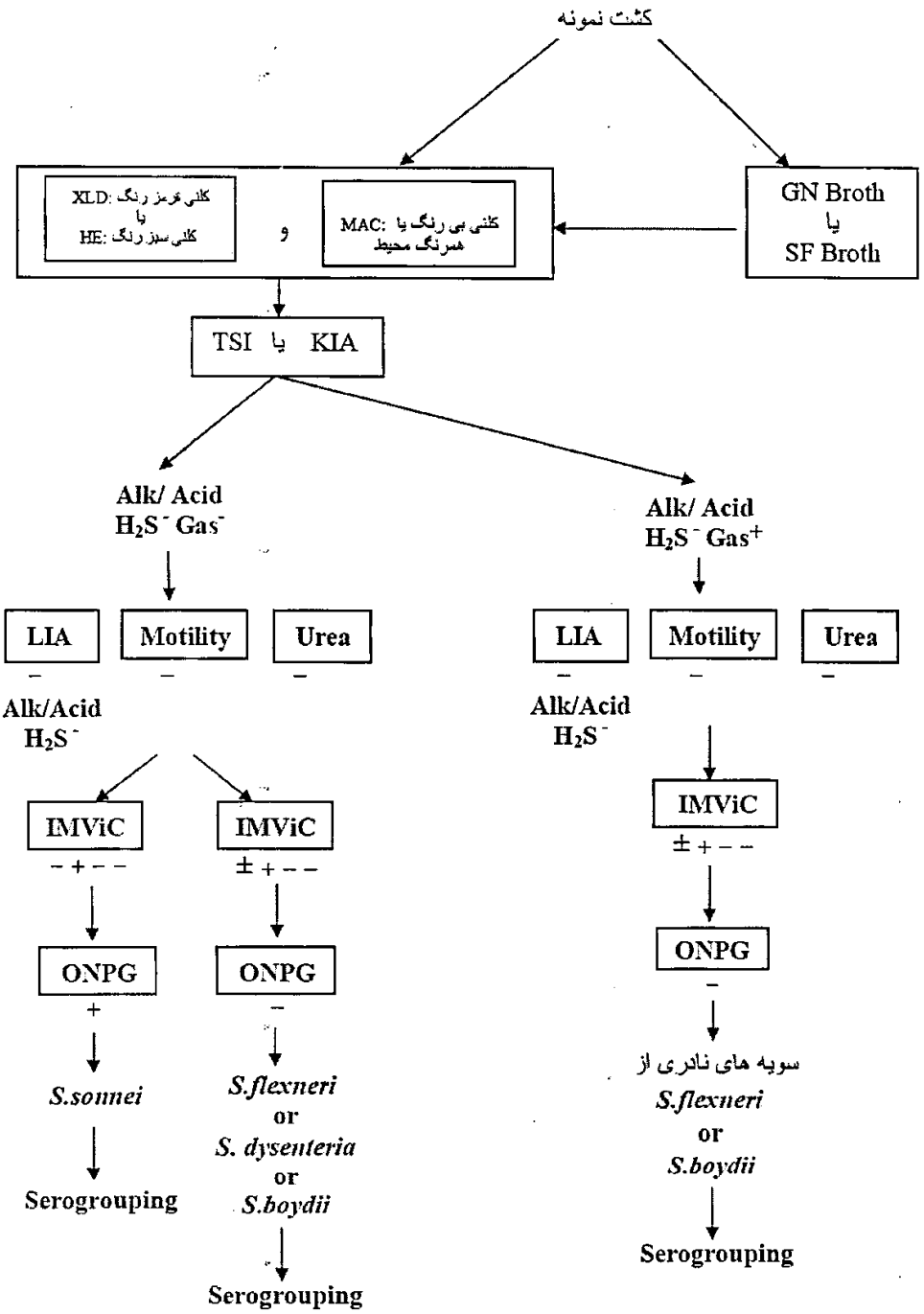
۳) برای بررسی "دکربوکسیلاسیون لیزین" از محیط Lysin Iron Agar (LIA) استفاده می‌شود. به هنگام تهیه این محیط باید دقت نمود حجم آن در لوله باید به مقداری باشد که محیط دارای ۴ سانتیمتر عمق و ۲ سانتیمتر سطح باشد. همچنین تلقیح باید دو بار در عمق محیط و یک بار روی سطح انجام شود تا شرایط بی‌هوازی لازم محیا گردد. ضمناً در طی انکوباسیون محیط LIA نیز باید در لوله یا پنبه آن برای تهویه شل باشد، در غیر اینصورت نتایج گمراه کننده‌ای بدست می‌آید.

۴) بررسی واکنش اوره‌آز در باکتری شیگلا باید بر روی محیط اوره آگار صورت گیرد. در تعیین واکنش اوره‌آز، این محیط از محیط اوره براث حساس‌تر است. لازم بذکر است اوره براث برای باکتری‌های با اوره‌آز بسیار قوی مانند پروتئوس مناسب‌تر است.

۵) در مواردی که نیاز به تشخیص سریع باشد، توصیه می‌گردد تست‌های بیوشیمیایی فلوچارت (۱) بطور همزمان انجام شود و با توجه به هزینه بالای آنتی‌سرم‌ها صرفاً در صورت تأیید بیوشیمیایی باکتری، تعیین سروگروه در نهایت انجام گردد.

در جدول شماره (۱) به برخی از واکنش‌های بیوشیمیایی که می‌توان بر اساس آنها گونه‌های مختلف جنس شیگلا را از یکدیگر متمایز کرد اشاره شده است (۴).

فلوچارت ۱- مراحل کشت، غربالگری و تشخیص بیوشیمیایی گونه‌های شیگلا:



جدول ۱- واکنش‌های بیوشیمیایی برای تشخیص گونه‌های شیگلا:

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

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

*** تذکر:**

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

۲) شیگلاها لاکتوز را تخمیر نمی‌کنند. اما شیگلا سونئی لاکتوز را در انکوباسیون طولانی (بیش از ۴۸ ساعت) تخمیر کرده و اسید تولید می‌کند.

۳) سروتایپ‌های شیگلا دیسانتری، شیگلا فلکسنری سروتایپ ۶ واریته Newcastele و شیگلا فلکسنری سروتایپ 2b مانیتول را تخمیر نمی‌کنند، ولی سایر گونه‌های شیگلا مانیتول را تخمیر می‌کنند.

۴) شیگلا سونئی و ۱۵٪ از شیگلا دیسانتری‌ها (سروتایپ ۱) و ۸٪ از شیگلا بوئیدی‌ها (سروتایپ ۹) تست ONPG مثبت داشته ولی سایر گونه‌های شیگلا ONPG منفی دارند.

۵) شیگلا سونئی، شیگلا دیسانتری سروتایپ ۱ و شیگلا فلکسنری سروتایپ ۶ اندول منفی‌اند. اما سایر گونه‌های شیگلا از این نظر متفاوت‌اند. لازم به ذکر است که شیوع سویه‌های اندول منفی بیشتر است.

۶) شیگلا سونئی Ornithine decarboxylase مثبت است، اما سایر شیگلاها از این نظر منفی هستند.

۳- تعیین سروگروه (Serogrouping):

پس از تشخیص جنس شیگلا، انجام آزمایش با آنتی‌سرم برای تأیید شیگلاها ضروری است. جنس شیگلا دارای ۴ سروگروه یا زیرگروه می‌باشد. سروگروه یا زیرگروه A دارای ۱۵ سروتایپ، B دارای ۸ سروتایپ، C دارای ۱۹ سروتایپ و D فقط دارای یک سروتایپ می‌باشد.

Species and serogroups of *Shigella*

Species	Serogroup designation	Serotypes
S. dysenteriae	Serogroup A	1-15
S. flexneri	Serogroup B	1-8
S. boydii	Serogroup C	1-19
S. sonnei	Serogroup D	1

تعیین سروگروه (Serogrouping) بوسیله آگلوتیناسیون بر روی لام با آنتی‌سرم‌های پلی‌والان ضد آنتی‌ژن سوماتیک O شامل poly A ، poly B ، poly C و poly D انجام می‌شود. لازم بذکر است برای تشخیص اختصاصی سروتایپ‌ها (Serotyping) باید از آنتی‌سرم‌های مونووالان استفاده شود. تعیین سروتایپ فقط در آزمایشگاه‌های مرجع صورت می‌گیرد.

در مواردی که سویه مورد آزمایش با آنتی‌سرم poly group A آگلوتینه شود، این سویه بعنوان شیگلا دیسانتری تأیید می‌شود و برای تعیین سروتایپ باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان یا آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال شود.

سروتایپ ۱ شیگلا دیسانتری (Sd1) همه‌گیری‌های گسترده، طولانی و شدید با مرگ و میر فراوان ایجاد می‌کند لذا شناسایی آن از اهمیت خاصی برخوردار است.

قبل از انجام آزمایش با آنتی‌سرم، لازم است بروشور داخل بسته آنتی‌سرم بطور کامل مطالعه شود. برای انجام آزمایش یک لام تمیز برداشته و در یک انتها یک قطره سرم فیزیولوژی و در کنار آن یک قطره آنتی‌سرم قرار دهید. از روی محیط KIA یا TSI بوسیله لوپ، آنس یا اپلیکاتور چوبی کمی کلنی برداشته، ابتدا در قطره سرم فیزیولوژی و سپس در قطره آنتی سرم سوسپانسیون کاملاً یکنواختی تهیه کنید. لام را به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه (با توجه به توصیه کارخانه سازندهٔ آنتی‌سرم این زمان متفاوت است) بصورت دورانی حرکت دهید. تشکیل ذرات آگلوتیناسیون را زیر نور چراغ مطالعه به دقت بررسی کنید. البته ابتدا مطمئن شوید که سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی بخوبی تهیه شده و فاقد ذرات درشت آگلوتینه می‌باشد.

الف- اگر پس از هم‌زدن باکتری در قطره سرم فیزیولوژی ذرات آگلوتیناسیون ایجاد شود، واکنش آگلوتیناسون خودبخودی است (autoagglutination) که به علت کلنی‌های خشن (rough) ایجاد می‌شود. در این صورت تشکیل ذرات آگلوتیناسیون در قطره آنتی‌سرم فاقد ارزش خواهد بود. چنین سویه‌ای برای تعیین هویت باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آن جا به آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال شود. شایان ذکر است گاهی استفاده از کلنی‌های رشدیافته بر روی محیط‌های حاوی قند زیاد مانند KIA یا TSI می‌تواند باعث ایجاد آگلوتیناسیون خودبخودی شود. لذا در این موارد بایستی کلنی را ابتدا بر روی محیط بدون قند مانند بلاد آگار کشت داده و آزمایش سرولوژیک مجدداً بر روی آن انجام شود (۷).

ب- اگر سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی یکنواخت بوده و فاقد ذرات اتوآگلوتیناسیون باشد و صرفاً پس از مخلوط کردن آن با آنتی‌سرم ذرات آگلوتیناسیون تشکیل شود، واکنش مثبت می‌باشد.

ج- در سویه‌های جداشده که از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی شبیه شیگلا هستند، اما با آنتی‌سرم‌های پلی‌والان شیگلا آگلوتینه ضعیفی داده یا آگلوتیته نمی‌شوند، احتمال پوشیده شدن آنتی‌ژن سوماتیک (O) بوسیله آنتی‌ژن کپسولی (K) باکتری وجود دارد. در این موارد برای از بین بردن آنتی‌ژن کپسولی باید:

۱) سوسپانسیون غلیظی از سویه جدا شده در سرم فیزیولوژی استریل تهیه نموده و در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه حرارت دهید (برای این منظور لوله سوسپانسیون باکتری را در داخل ظرف آبجوش قرار دهید).

۲) سپس سوسپانسیون باکتری را بمدت ۱۵-۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ سانتریفوژ کرده و رسوب‌گیری نمایید. یک قطره از رسوب باکتری را برای بررسی ایجاد اتوآگلوتیناسیون با یک قطره سرم فیزیولوژی آزمایش کنید.

۳) اگر سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی اتوآگلوتیناسیون ایجاد نکرد، مطابق روش قبل آن را با هر کدام از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان مجاور کنید.

*** تذکر:**

۱) به هیچ وجه نباید برای انجام آزمایش سرولوژی (تعیین سروگروه) از کلنی‌های رشدیافته بر روی محیط‌های انتخابی مانند XLD یا مک‌کانکی آگار استفاده شود، زیرا نتایج گمراه کننده‌ای بدست می‌آید.

۲) تمام سویه‌هایی که از نظر بیوشیمیایی بعنوان شیگلا تشخیص داده می‌شوند اما در آزمایش با آنتی‌سرم منفی هستند، باید برای تشخیص قطعی به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و از آنجا به آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال شوند.

۳) همه آنتی‌سرم‌ها باید قبل از استفاده، جهت اطمینان از واکنش‌های مورد انتظار به لحاظ کیفی تحت کنترل قرار گیرند. برای کنترل کیفی هر آنتی‌سرم باید از سوش‌های استاندارد کنترل مثبت و منفی که توسط کارخانه تولیدکننده آن توصیه می‌شود (به بروشور هر کیت آنتی‌سرم مراجعه شود) استفاده کرد.

٤- آزمایش تعیین حساسیت:

گاستروانتریت‌های خفیف معمولاً بدون درمان آنتی‌بیوتیکی بهبود می‌یابند. اما بدلیل ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی گسترده در بین سویه‌های شیگلا، برای تمامی سویه‌های جدا شده باید آزمایش تعیین حساسیت میکروبی انجام شود. گزارش نتایج آزمایش تعیین حساسیت به پزشک برای شیگلا دیسانتری سروتایپ ۱ (Sd1) حائز اهمیت است. چراکه در بعضی نواحی آسیا و آفریقا سویه‌های Sd1 به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مانند نالیدیکسیک اسید مقاوم شده‌اند، اما هنوز به فلوروکینولون‌ها مانند سیپروفلوکساسین حساس‌اند. بطور معمول آمپی‌سیلین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، یک فلوروکینولون مانند سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی برای آزمایش تعیین حساسیت ایزوله‌های شیگلا و گزارش به پزشک می‌باشند.

❊ تذکر:

هرچند گونه‌های شیگلا (و سالمونلاهایی که از مدفوع ایزوله می‌شوند) در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) ممکن است نسبت به نسل اول و دوم سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوزیدها (مانند جنتامیسین و آمیکاسین) حساس باشند، اما از نظر بالینی این آنتی‌بیوتیک‌ها در بدن مؤثر نبوده و لذا نباید استفاده و گزارش شوند.

در جدول شماره (۲) دیسک‌های آنتی‌بیوگرام توصیه شده برای ارزیابی حساسیت آزمایشگاهی سویه‌های شیگلا (و سالمونلا) ایزوله شده از کشت مدفوع و نیز چگونگی تفسیر قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده در اطراف آنها براساس استاندارد CLSI آورده شده است (۸).

جدول ۲- جدول استاندارد CLSI برای تفسیر قطر هاله‌های عدم رشد در آنتی‌بیوگرام شیگلا و سالمونلا

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

مراحل تشخیص سالمونلا:

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

در حال حاضر شیوه نامگذاری و نحوه نگارش علمی سویه‌های سالمونلا بصورت زیر می‌باشد:

۱- ابتدا نام جنس باید بصورت **ایتالیک** نوشته شود: *Salmonella*

۲- نام گونه بصورت **ایتالیک** نوشته شود: مثلاً *enterica*

۳- نام سروتایپ بصورت **غیر ایتالیک** و حرف اول آن بصورت بزرگ نوشته شود. مثلاً Typhi

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

Salmonella enterica subspecies *enterica* serotype Paratyphi B

هر چند در این روش اصول و ضوابط کلی نامگذاری رعایت شده است اما پزشکان و میکروب‌شناسان بالینی، نامگذاری ساده‌تری را برای گزارش روزمره این باکتری استفاده می‌کنند که در آن نام اختصاصی سروتایپ مقدم می‌باشد:

Salmonella serotype Paratyphi B یا *Salmonella* Paratyphi B

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

1) Non-typhoidal *Salmonella* 2) *Salmonella* Typhi 3) *Salmonella* Paratyphi A

۱- خصوصیات کلنی سالمونلا:

کلنی سویه‌های سالمونلا بر روی محیط مک‌کانگی آگار بی‌رنگ یا همرنگ محیط، در روی HE آبی یا سبز مایل به آبی با مرکز سیاه و بر روی محیط XLD قرمز رنگ با مرکز سیاه می‌باشند. البته در مواردی ممکن است تولید H_2S تا ۴۸ ساعت بعد صورت گیرد.

۲- تشخیص بیوشیمیایی:

در صورت رشد کلنی‌های مشکوک به سالمونلا بر روی هر یک از محیط‌های کشت مک‌کانگی آگار، XLD یا HE باید با استفاده از کلنی‌های کاملاً ایزوله، باکتری را برای انجام تست‌های بیوشیمیایی در محیط‌هایی مانند KIA یا TSI غربالگری کرد. در صورت کم بودن کلنی می‌توان با استفاده از آنس نوک تیز کلنی مشکوک را برداشته و سوسپانسیونی از آن در داخل ۰/۵-۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل تهیه کرده و از آن برای انجام همه تست‌های بیوشیمیایی استفاده کرد. در صورتی که کلنی کاملاً ایزوله روی محیط وجود ندارد می‌توانید از کلنی‌های مشکوک برداشته روی پلیت دیگری بصورت خطی (streak) کشت داد تا کلنی‌های خالص به دست آید. محیط‌های KIA (TSI) را باید مطابق آنچه در مبحث شیگلا توضیح داده شد تلقیح و انکوبه نمود.

اکثر سویه‌های سالمونلا بر روی محیط کشت KIA (TSI) واکنش Alk/Acid همراه با گاز (+) و H_2S تولید می‌کنند. لازم به ذکر است باکتری Typhi *Salmonella* در این دو محیط واکنش Alk/Acid بدون تولید گاز و با مقدار کم H_2S (صرفاً در امتداد خط تلقیح آنس) ایجاد می‌نماید.

محیط Lysine Iron Agar (LIA) نیز محیط غربالگری مناسبی است، زیرا سویه‌های سالمونلا به استثنای سالمونلا پاراتیفی A ، لیزین را دکربوکسیله کرده و اغلب H_2S تولید می‌کنند. بدین گونه که روی محیط LIA منظره Alk/Alk (سطح بنفش و عمق بنفش) با تولید H_2S درعمق مشاهده می‌شود.

سویه‌هایی که با تست‌های غربالگری فوق واکنش‌های مشخص سالمونلا را ایجاد می‌کنند، باید با مجموعه‌ای از تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شده (جداول ۳ و ۴ و فلوچارت شماره ۲) و سپس با آنتی‌سرم‌های پلی‌والان ضد O (گروه A، B، C و D) مورد آزمایش سرولوژیک قرار گیرند. این سویه‌ها را می‌توان برای تأیید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان و یا آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال نمود.

جدول ۳- تست‌های بیوشیمیایی جهت افتراق سالمونلا از سایر انتروباکتریاسه و تشخیص سالمونلا تیفی و سالمونلا پاراتیفی A

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

*** توضیحات جدول:**

۱) واکنش مثبت در ۹۰ درصد موارد بعد از ۲ روز ایجاد می‌شود.

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

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

۴) سالمونلاها اندول منفی و اوره منفی (اوره آگار) هستند لذا در صورت مثبت شدن هر کدام، جنس سالمونلا رد می‌شود.

*** موارد استثناء واکنش‌های بیوشیمیایی تشخیص سالمونلا**

۱) **تولید H_2S:** اکثر سالمونلاها در محیط‌های KIA و TSI رسوب H_2S تولید می‌کنند. اما سروتایپ پاراتیفی A و ۵۰٪ از سویه‌های کلراسوئیس H_2S منفی‌اند.

۲) **تولید گاز** در محیط‌های **KIA** یا **TSI**: همه سویه‌های سالمونلاها در این دو محیط گاز تولید می‌کنند. اما سالمونلا تیفی و سالمونلا گالیناروم (Gallinarum) از این نظر مستثنی بوده و هرگز ایجاد گاز نمی‌کنند.

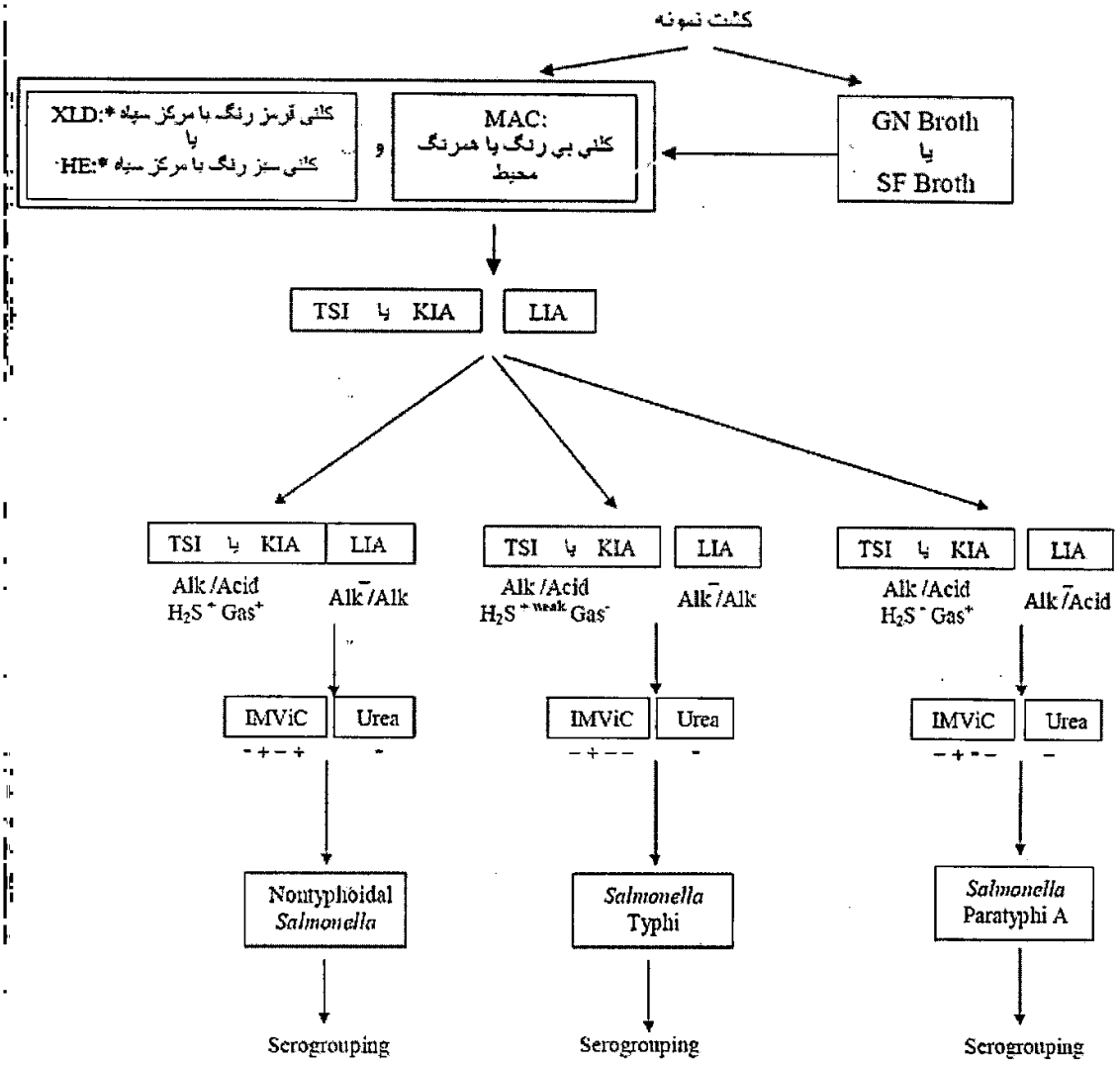
۳) **مصرف سیترات:** اکثر سالمونلاها از سیترات به عنوان تنها منبع کربن استفاده می‌کنند، اما برخی از سروتایپ‌ها مانند تیفی، پاراتیفی A، گالیناروم و پولوروم (Pullorum) و اکثر سویه‌های سالمونلا کلراسوئیس سیترات منفی‌اند.

۴) **دکربوکسیلاسیون لیزین:** سالمونلاها لیزین دکربوکسیلاز مثبت‌اند، به استثناء سالمونلا پاراتیفی A که لیزین منفی است.

۵) **حرکت:** همه سالمونلاها حرکت مثبت‌اند، به استثناء سالمونلا گالیناروم و پولوروم که غیر متحرک هستند.

۶) **دکربوکسیلاسیون اورنیتین:** همه سالمونلاها اورنیتین دکربوکسیلاز مثبت‌اند، به استثناء سالمونلا تیفی و گالیناروم.

فلوچارت ۲- جداسازی، غربالگری و تشخیص بیوشیمیایی سالمونلا



*** توضیحات فلوچارت:**

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

اگر باکتری مورد آزمون از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی بطور مشخص شبیه سالمونلا بوده، اما با آنتی‌سرم‌های سالمونلا آگلوتینه نمی‌شود، سویه مذکور باید جهت شناسایی دقیق‌تر به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان یا آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال شود.

از آن جایی که تولید H_2S یکی از واکنش‌های مهم در تشخیص سالمونلا می‌باشد، لذا افتراق آن از سایر انتروباکتریاسه‌های H_2S مثبت حائز اهمیت است. برای این منظور می‌توان از جدول شماره (۴) استفاده کرد:

جدول ٤- تست‌های بیوشیمیایی تشخیصی جهت افتراق سالمونلا از سایر انتروباکتریاسه H_2S مثبت

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

*PAD; Phenylalanine Deaminase

❊ تذکر:

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

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

۳- تعیین سروگروه (Serogrouping):

استفاده از آنتی‌سرم در تشخیص سالمونلاها ضروری است. تعیین سروگروه به وسیله آگلوتیناسیون بر روی لام با آنتی‌سرم‌های سوماتیک (O) انجام می‌شود. آنتی‌سرم‌های پلی‌والان O مورد استفاده در تعیین سروگروه سالمونلا شامل آنتی‌سرم‌های گروه A تا E می‌باشد، زیرا حدود ۹۵٪ از سویه‌های سالمونلا متعلق به این گروه‌هاست. برای مثال سالمونلا تیفی و انتریتیدیس در سروگروه D ، کلراسوئیس و نیوپورت در سروگروه C و تیفی‌موریوم در سروگروه B قرار دارند. اما از آنجاییکه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و بهداشتی فقط آنتی‌سرم‌های پلی O مربوط به گروه‌های A، B، C و D موجود است، پس از تعیین اولیه سروگروه، سویه سالمونلا برای مراحل سروتایپینگ کامل که نیاز به آنتی‌سرم‌های فلاژلی (H) و کپسولی (Vi) دارد بایستی به آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال گردد.

مراحل انجام آزمایش‌های تعیین سروگروه سالمونلا باید مطابق آنچه در مبحث شیگلا آمده است، انجام شود و در مواجهه با موارد ذیل، سویه باکتریایی مورد آزمون باید به آزمایشگاه مرکز بهداشت استان یا آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال شود:

۱) اگر سویه مورد آزمون از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی بطور مشخص شبیه سالمونلاها است، اما با آنتی‌سرم‌های سالمونلا آگلوتینه نمی‌شود (شایان ذکر است با توجه به اینکه یکی از دلایل عدم پاسخ باکتری در مواجهه با آنتی‌سرم‌های O وجود کپسول و پوشیده شدن آنتی‌ژن O با لایه کپسولی می‌باشد، لذا در این موارد لازم است قبل از ارسال سویه به آزمایشگاه مرجع مطابق روش گفته شده در مبحث شیگلا، آزمایش سرولوژی را مجدداً پس از حرارت دادن باکتری تکرار کرد).

۲) اگر سویه مورد آزمون از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی همه مشخصه‌های سالمونلا را ندارد، اما با آنتی سرمهای سالمونلا آگلوتیناسیون ایجاد می‌کند.

٤- آزمایش تعیین حساسیت:

درمان ضدمیکروبی برای موارد گاستروانتریت خفیف سالمونلایی پیشنهاد نمی‌شود، چون می‌تواند موجب طولانی شدن دوره ناقلی بیمار گردد. علاوه بر این، هرچند آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای سویه‌های جدا شده از مدفوع جهت درمان توصیه نمی‌گردد (برخلاف سویه‌های ایزوله شده از نواحی دیگر مثل خون یا CSF) اما تعیین الگوی مقاومت ضدمیکروبی بمنظور پایش وضعیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سالمونلا حائز اهمیت و ضروری است.

بهرحال، درمان آنتی‌بیوتیکی در بیماران با عفونت مهاجم سالمونلا و تیفوئید بسیار مهم و حیاتی است بنابراین، پس از انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام نتیجه باید به پزشک گزارش شود.

به طور معمول آمپی‌سیلین، یک فلوروکینولون مانند سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول و نالیدیکسیک اسید آنتی‌بیوتیک‌های اننخابی جهت آزمایش تعیین حساسیت گونه‌های سالمونلا جدا شده از مدفوع و گزارش به پزشک می‌باشند. لازم به ذکر است در مواردی که نتیجه آنتی‌بیوگرام نالیدیکسیک اسید مقاوم و سیپروفلوکساسین حساس باشد، احتمال ایجاد مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین نیز در حین درمان وجود دارد. این مورد بویژه در عفونت‌های مهاجم و سالمونلاهای جدا شده از کشت خون باید به پزشک تذکر داده شود.

در مواردی که سالمونلا از کشت خون یا CSF جدا می‌شود، علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌های قبلی، حساسیت باکتری باید نسبت به سفالوسپورین‌های نسل سوم (مانند سفتریاکسون) و کلرامفنیکل نیز باید ارزیابی و گزارش شود.

*** تذکر مهم:**

هر چند گونه‌های سالمونلا و شیگلا ممکن است در محیط آزمایشگاه (in vitro) نسبت به نسل اول و دوم سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوزیدها مانند جنتامیسین و آمیکاسین حساس باشند، اما از نظر بالینی این آنتی‌بیوتیک‌ها در موارد گاستروانتریت مؤثر نبوده و بنابراین نباید نتیجه آنتی‌بیوگرام آنها به پزشک گزارش شوند. البته این موضوع صرفاً زمانی است که این باکتری‌ها از کشت مدفوع ایزوله شوند. در صورتی که سالمونلا از نمونه بالینی دیگری مثل خون جدا شده باشد علاوه بر ارزیابی حساسیت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های یاد شده، نتیجه آنتی‌بیوگرام نیز باید گزارش گردد.

بمنظور تفسیر قطر هاله‌های عدم رشد در آنتی‌بیوگرام ایزوله‌های سالمونلا به جدول مربوطه در مبحث شیگلا رجوع شود.

سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک:

در بررسی‌های به عمل آمده توسط مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌های امریکا (CDC) در سال ۲۰۰۰ میلادی ۵۰٪ از گونه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم (سروگروه B) جدا شده از نمونه‌های بالینی به یک یا بیش از یک آنتی‌بیوتیک و ۲۸٪ آنها به پنج آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده‌اند. در سال ۲۰۰۱ نیز ۲۶٪ از سالمونلا نیوپورت‌های جدا شده (سروگروه C) حداقل به ۹ آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده‌اند. اما متأسفانه اطلاعات کافی درباره مقاومت‌های چندگانه دارویی ایزوله‌های سالمونلا در ایران وجود

ندارد. شایان ذکر است در مواجهه با چنین مواردی، سویه مورد نظر باید جهت بررسی‌های تکمیلی و انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی (مانند تعیین حداقل غلظت مهاری آنتی‌بیوتیک‌ها) به آزمایشگاه مرجع کشوری ارسال گردد.

نحوه گزارش نتایج کشت مدفوع از نظر شیگلا و سالمونلا:

۱) در موارد کشت مثبت:

پس از ایزولاسیون و تعیین هویت پاتوژن، باکتری جدا شده به صورت نیمه کمی بر اساس تعداد کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت‌های اولیه (Light, Moderate, Heavy) گزارش می‌گردد. مثال:

"Heavy growth of Non-typhoidal *Salmonella* serogroup D isolated."

۲) در موارد کشت منفی، به این طریق گزارش نمایید:

"No *Solmonella* and *Shigella* isolated" یا "*Salmonella* and *Shigella* species not found"

تشخیص اشریشیا کلی‌های پاتوژن:

با توجه به اینکه سویه‌های EHEC (STEC) اشریشیا کلی به لحاظ توانایی ایجاد همه‌گیری، مرگ و میر بالا و عوارض پس از عفونت (آسیب‌های کلیوی و غیره) از جایگاه خاصی در میان سایر پاتوتایپ‌های اشریشیا کلی برخوردار هستند، از همین رو ایزولاسیون و تعیین هویت سریع باکتری جهت درمان بموقع، بهبود پیش آگهی بیماران و پیشگیری از انتقال عفونت به سایر افراد جامعه بسیار مؤثر می‌باشد، لذا در این بخش به روش‌های شناسایی آزمایشگاهی این سویه پرداخته می‌شود. حداقل ۱۵۰ سروتایپ مختلف از اشریشیا کلی EHEC در دنیا شناخته شده است که شایع‌ترین و مهم‌ترین سویه *E. coli* O157:H7 می‌باشد. عامل اغلب موارد بیماری که با درگیری کلیوی و سندرم همولیتیک-اورمیک (HUS) همراه است، همین سویه

می‌باشد. از دیگر سروگروه‌های مطرح این باکتری که تحت عنوان non-O157 EHEC نام برده می‌شوند می‌توان به سروگروه‌های O26، O45، O103، O111، O121 و O145 اشاره کرد.

۱- معیارهای انتخاب نمونه:

برای جداسازی سویه‌های EHEC لازم است تمام نمونه‌های مدفوع اسهالی حاد (Acute community-acquired diarrhea) و نیز نمونه مدفوع بیماران دچار سندرم HUS بررسی شوند. در این راستا توجه به این نکته ضروری است که نباید بررسی نمونه‌ها صرفاً به فصل تابستان، نمونه‌های مدفوع کودکان، نمونه‌های حاوی لوکوسیت و یا مدفوع اسهالی حاوی خون محدود شوند. چراکه در برخی موارد اسهال‌های ناشی از این باکتری، مدفوع بیمار فاقد سلولهای WBC و RBC می‌باشد. هرچند در اغلب موارد، بیماری ناشی از این باکتری در کودکان کمتر از ۵ سال دیده می‌شود اما تعداد قابل توجهی از سویه‌های EHEC از افراد بالای ۱۲ سال نیز گزارش شده است. از سوی دیگر علیرغم شایع‌تر بودن عفونت EHEC در ماه‌های تابستان، اما در سایر ایام سال نیز امکان بروز بیماری وجود دارد.

در صورتی که اسهال مربوط به بیماری است که ۳ ≤ روز از بستری شدن او در بیمارستان می‌گذرد نیازی به بررسی نمونه از نظر EHEC وجود ندارد چراکه در غالب این موارد، عامل اسهال حاد *Clostridium difficile* می‌باشد. البته باید توجه داشت هرچند اسهال ناشی از سویه‌های EHEC اصولاً بفرم حاد بروز می‌کند اما در صورتیکه علامتی به نفع سایر پاتوژن‌های مدفوعی یافت نشود باید اسهال‌های طول کشیده را نیز از نظر این باکتری بررسی نمود.

*** نکته:**

برای ارسال نمونه‌های مدفوعی مشکوک به EHEC ، محیط انتقالی کری-بلر مناسب است. با اینحال اگر قرار است وجود سم Shiga-like toxin بصورت مستقیم در مدفوع بررسی شود، در اینصورت نباید نمونه در محیط انتقالی ارسال گردد.

۲- کشت مدفوع و شناسایی EHEC:

سویه‌های O157 EHEC بعلت عدم توانایی تخمیر قند سوربیتول (طی ۲۴ ساعت) و ایجاد کلنی‌های بیرنگ (به قطر ۳-۲ میلی‌متر) براحتی از سایر سویه‌های *E. coli* موجود در نمونه مدفوع (کلنی‌های صورتی) قابل افتراق هستند. لذا برای شناسایی

اولیه این باکتری‌ها لازم است نمونه مدفوع بیمار ابتدا بر روی یک پلیت محیط انتخابی و افتراقی حاوی سوربیتول مانند سوربیتول مک‌کانگی آگار (SMAC)، سفیکسیم تلوریت سوربیتول مک‌کانگی آگار (CT-SMAC) و یا CHROMagar O157 کشت داده شود. چون دو محیط اخیر انتخابی‌تر از محیط SMAC هستند، در صورتی که از آنها برای کشت نمونه استفاده شود حساسیت آزمایش برای ایزولاسیون سویه‌های O157 افزایش می‌یابد. برای مثال سویه‌های نادری از O157 که غیرمتحرک و تخمیرکننده سوربیتول هستند روی محیط CT-SMAC رشد نمی‌کنند.

برای شناسایی بیشتر سویه‌های O157 کافیست مقداری از کلنی سوربیتول منفی را برداشته و در تست آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم اختصاصی O157 ارزیابی کرد. برای این منظور توصیه می‌شود تست آگلوتیناسیون را با سه کلنی مختلف، سه بار تکرار کرد.

در صورت تأیید سویه بعنوان O157 ، لازم است باکتری را بر روی یک محیط غیرانتخابی نظیر TSA یا بلاد آگار ساب کالچر داده و از این کلنی‌های بمنظور تلقیح محیط‌های کشت بیوشیمیایی و تأیید باکتری بعنوان اشریشیا کلی استفاده کرد. چراکه احتمال بروز واکنش‌های سرولوژیک متقاطع بین آنتی‌سرم‌های O157 و سایر باکتری‌ها وجود دارد.

پس از تأیید قطعی باکتری بعنوان اشریشیا کلی O157 لازم است تمام ایزوله‌های باکتری جهت انجام تست‌های تکمیلی به آزمایشگاه رفرانس کشوری ارجاع داده شوند. در این مرحله تمام سوش‌های متحرک باکتری جهت شناسایی سویه H7 با استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی بر ضد آنتی‌ژن H مورد ارزیابی قرار گرفته و همزمان با استفاده از آزمایش‌های ایمونواسی آنزیمی (EIA) و PCR تولید سم شیگا توکسین و یا وجود ژن‌های مولد سم (*stx1, stx2*) در باکتری‌ها بررسی می‌شود.

برخلاف سویه‌های O157 EHEC شناسایی و تشخیص ایزوله‌های non-O157 EHEC دشوار بوده و صرفاً در آزمایشگاه‌های رفرانس انجام می‌گیرد.

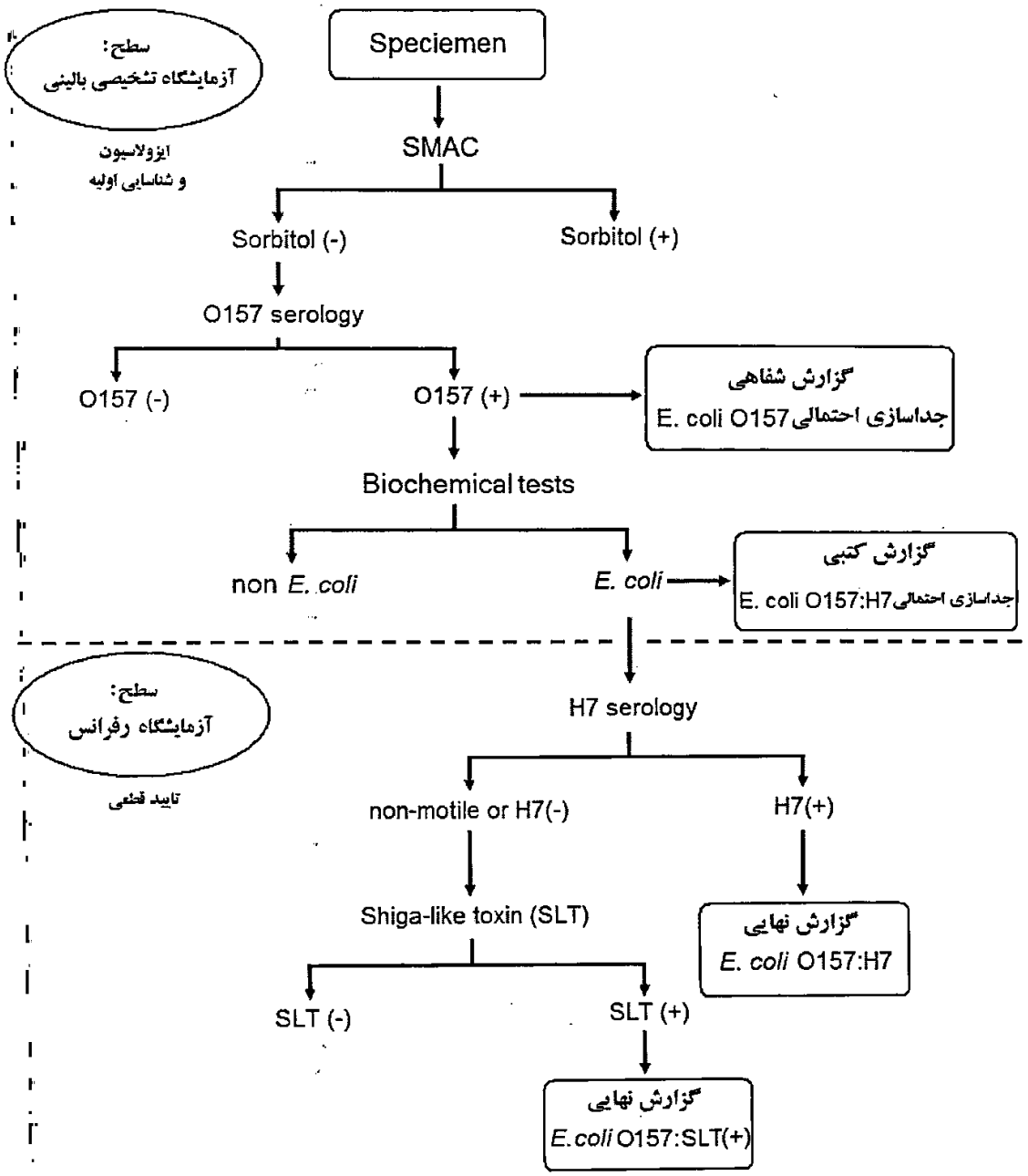
برای ایزولاسیون سویه‌های non-O157 EHEC ، محیط کشت مایع باکتری که در تست EIA از نظر توکسین شیگا مثبت شده است را باید بر روی یک محیط آگار با حداقل خاصیت انتخابی (مانند مک‌کانگی آگار، سوربیتول مک‌کانگی آگار یا بلاد آگار) ساب کالچر کرد. کلنی‌های مشکوک به اشریشیا کلی باید بر اساس خصوصیات ظاهری انتخاب شوند. اغلب سویه‌های non-O157 اشریشیا کلی قادرند هر دو قند لاکتوز و سوربیتول را تخمیر نمایند. سپس با استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی

O شایع (غیر از سروگروه ۱۵۷)، نوع سروگروه باکتری (مانند سروگروه‌های ۲۶، ۴۵، ۱۰۳، ۱۱۱، ۱۲۱ و ۱۴۵) تعیین می‌شود. در ادامه جهت تأیید توکسین‌زایی سویه‌ها از روش PCR و بمنظور تعیین ساب‌تایپ‌ها از روش PFGE استفاده می‌شود (۹).

شایان ذکر است هرچند درمان آنتی‌بیوتیکی بیماران در موارد ابتلا به عفونت‌های ناشی از سویه‌های EHEC می‌تواند باعث وخیم‌تر شدن وضعیت بیمار و تسریع روند ایجاد سندرم HUS گردد. با اینحال آزمایشگاه میکروب‌شناسی موظف است در صورت ایزولاسیون و شناسایی این باکتری، ضمن انجام تست‌های ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، نتایج آنتی‌بیوگرام را به پزشک گزارش نماید.

در فلوچارت شماره (۳) مراحل جداسازی، تشخیص آزمایشگاهی اولیه و تأیید قطعی سویه‌های EHEC به نمایش گذاشته شده است.

فلوچارت ۳- مراحل جداسازی، تشخیص آزمایشگاهی اولیه و قطعی سویه‌های EHEC



در نهایت، جدول خصوصیات کلیدی برای تشخیص باکتری‌های شایع خانواده انتروباکتریاسه آورده شده است:

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

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

*Swarming motility demonstrated on noninhibitory media.

†Nonmotile at 36°C, motile at 22°C.

مراجع:

1. Vandepitte, J. et al, Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, World Health Organization, 2nd edition, 2003.

2. Murray, P.R. et al; Manual of Clinical Microbiology, ASM, 8th edition, 2003.

3. Connie, R. Mahon; Textbook of Diagnostic Microbiology, 3th edition, 2007.

4. Koneman, E.W. et al; Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott, 6th edition, 2006.

5. Isenberg, H.D; Essential Procedures for Clinical Microbiology, ASM, 1998.

6. Isenberg, H.D; Clinical Microbiology Procedures Handbook, ASM, 2004.

7. Forbes, A.B; Baily & Scott's; Diagnostic Microbiology, 12th edition, 2007.

8. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI approved standard M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. Wayne, PA, 2007.

9. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for diagnosis of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2009; 58(PR-12).

۱۰) روش‌های آزمایشگاهی مورد استفاده در تشخیص همه‌گیری‌های وبا و اسهال خونی، مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌های آمریکا، سازمان بهداشت جهانی، ترجمه دکتر کامران حکیم‌زاده، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، مرکز مدیریت بیماریها.