دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

روش جداسازی ، شمارش و شناسایی استافیلوکوکوس آرئوس در مواد غذایی

تهیه کننده : سهیلا عباسی

مقدمه :

استافیلوکوکوس ها به خانواده *میکروکوکاسه* تعلق دارند، باکتری هایی هستند گرم مثبت، کروی شکل و بر خلاف *استرپتوکوکوس ها* کاتالاز مثبت هستند. اکثر سویه های *استافیلوکوکوس آرئوس* پیگمان طلایی رنگ تولید می کنند و پلاسمای خون را منعقد می سازند، در صورتی که *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* پیگمان زا نبوده و قارد به تولید کو آگولاز نیست.

رشد *استافیلوکوکوس آرئوس* در مواد غذایی موجب به مخاطره افتادن بهداشت عمومی می گردد. زیرا بسیاری از سویه های این میکروارگانیسم انتروتوکسین ترشح می کنند که در صورت بلع موجب مسمومیت غذایی می شوند. دلایل بررسی *استافیلوکوکوس* در مواد غذایی عبارت اند از:

الف : تائید این میکروارگانیسم به عنوان ماده ی غذا زاد

ب : تعیین اینکه آیا غذا یا یکی از اجزا متشکله آن یک منشا بالقوه مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می باشد؟

- ج : روشن نمودن وضعیت آلودگی ماده غذایی بعداز فرایند، که معمولا به وسیله ی تماس انسان با آن و یا در معرض قرار گرفتن ماده غذایی فرایند شده با سطوح بهسازی نشده حاصل گردیده است. مواد غذایی که بعداز فرایند به وسیله سویه های استافیلوکوک مولد آنتروتوکسین آلوده می شوند، بسیار خطرناک می باشند زیرا میکروارگانیسم های رقیب که رشد *استافیلوکوک ها* را محدود می سازند، موجود نیستند.

- در مواد غذایی فرایند شده، وجود *استافیلوکوکوس آرئوس* در مواد غذا معمولا مبین آلودگی به وسیله ی پوست، دهان یا بینی افرادی است که با غذا سروکار دارند که ممکن است مستقیما در خطر تولید به وسیله ی کارگرانی که دارای زخم های *استافیلوکوکی* در روی دست و بازو ها هستند و یا در نتیجه سرفه و عطسه که معمولا در عفونت های دستگاه تنفسی ایجاد می گردد، وارد غذا شود.

- باقیمانده مواد غذایی آلوده که در سطح یا مجاورت سطوح تولید قرار می گیرند نیز باعث آلودگی ماده غذایی فرایند شده می گردند. وجود مقادیر زیاد *استافیلوکوکوس آرئوس* در ماده غذایی فرایند شده دلیل بر عدم رعایت بهداشت و یا عدم کفایت کنترل درجه حرارت و یا هر دو آن ها می باشد.

- در مواد غذایی خام مخصوصا فراورده های غذایی دامی، وجود *استافیلوکوکوس آرئوس* متداول بوده و ارتباط به آلودگی آنها توسط انسان ندارد.

- وجود آلودگی *استافیلوکوکی* در پروپوست حیوانات معمولا دیده می شود و احتمال دارد که از طریق زخم و بافت های آسیب دیده ایجاد شده باشد. آلودگی *استافیلوکوکی* در لاشه حیوانات پوست کنده نیز معمول و گاهی اجتناب ناپذیر است.

- شیر خام و فراورده های شیری غیر پاستوریزه حاوی مقادیر زیادی *استافیلوکوکی* حیوانات وارد شیر می شوند. تشخیص *استافیلوکوکوس آرئوس* تولید کننده آنتروتوکسین در مواد غذایی باید با توجه و دقت تمام صورت گیرد.

- محیط های کشت مورد استفاده در تشخیص و شمارش *استافیلوکوکوس آرئوس* ممکن است یک یا چند خصوصیت را نشان دهند.

- دو ماده شیمیایی سمی و انتخابی که اغلب در محیط های کشت *استافیلوکوکوس آرئوس* به کار می روند، کلرورسدیم و تلوریت پتاسیم می باشند که از غلظت های مختلف آن استفاده می گردد. این غلظت ها از مقادیر ۵/۵ درصد تا ۱۰ درصد برای کلروسدیم و از ۰/۰۰۲۵ درصد تا ۰/۰۵ درصد جهت تلوریت پتاسیم متغییر می باشد.

- سایر موارد شیمیایی مانند سولفات آمونیوم ، اسید سوربیک ، گلیسیرین ، کلرورلیتیوم و پلی میکسین غالبا همراه با کلرورسدیم و تلوریت پتاسیم به محیط اضافه می شوند.
- آزیدسدیم به تنهایی یا همراه با کلرورسدیم و نئومایسین در محیط های کشت انتخابی جهت جداسازی به کار می روند.
- محیط ها ی کشت حاوی عوامل انتخابی مشخص با غلظت های مشابه از نظر pH با یکدیگر اختلاف دارند. سایر اختلافاتی که در محیط های کشت وجود دارند مربوط به تجمع و اختلاط عوامل انتخابی و یا تفاوت در ترکیب اشکال تشخیص هستند.

- صور تشخیصی اساسی که در محیط های کشت از آن ها استفاده می شود شامل موارد زیر می باشند:

1. توانایی *استافیلوکوکوس آرئوس* جهت رشد در حضور غلظت ۷/۵ تا ۱۰ درصد کلروسدیم.
2. توانایی *استافیلوکوکوس آرئوس* جهت رشد در حضور ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ درصد تلوریت پتاسیم همراه با ۰/۲ تا ۰/۵ درصد کلرورلیتیوم و ۰/۱۲ تا ۱/۲۶ درصد گلیسین یا ۴۰ میکروگرم در هر میلی لیتر پلی میکسین.
3. توانایی *استافیلوکوکوس آرئوس* جهت احیا تلوریت پتاسیم و ایجاد کلنی های سیاهرنگ
4. شکل کلنی و میکروسکوپی میکروارگانیسم
5. رنگی شدن کلنی های باکتری بر حسب نوع محیط کشت
6. فعالیت کواگولاز و تولید اسید در محیط کشت جامد
7. توانایی *استافیلوکوکوس آرئوس* جهت هیدرولیز تخم مرغ یا DNA
8. جهت تشخیص *استافیلوکوکوس آرئوس* غالبا آزمایش تائیدی که آزمون کواگولاز است مورد استفاده قرار می گیرد.

- تست کواگولاز :
- این تست دقیق ترین آزمایش است که به کمک آن می توان *استافیلوکوکوس آرئوس* را از گونه های دیگر این جنس تشخیص داد. پژوهشگران و محققان در پی تحقیقات و آزمایشات متناوبی که بر روی آنزیم کواگولاز و نحوه ی عمل مکانیسم آن انجام دادند به مطالبی دست یافتند که عبارتند از:
- الف) کواگولاز پیشاهنگ یک ماده ی ترومبین مانند است که برای فعال شدن به یک فعال کننده که در پلاسمای بسیار از جانوران وجود دارد نیازمند است. (پلاسمای برخی از موجودات مانند: موش، خوکچه هندی و ماکیان فاقد این فعال کننده می باشند) .
- ب) ماده ترومبین مانند نسبت به حرارت حساس بوده و تراکم آن در هر زمان بستگی به دما، زمان و تراکم معرف ها دارد.
- پ) کواگولاز به حرارت مقاوم بوده و قابل صاف شدن است.
- ت) پلاسمای خون موجوداتی که توسط کواگولاز منعقد نمی شوند، فاقد فعال کننده هستند.
- ث) توانایی انعقاد پلاسما توسط کواگولاز به یون کلسیم بستگی ندارد.

- مکانیسم عمل کواگولاز :
- در پی آزمایشات متعدد درباره مکانیسم عمل کواگولاز مشخص شد که دو نوع کواگولاز وجود دارد :

1. کواگولاز متصل به دیواره سلولی
2. کواگولاز آزاد که بعد از تولید توسط سلول به خارج از آن ترشح می گردد.

- امروزه مشخص شده است که پدیده گلوله شدن بر روی لام مربوط به نوع کواگولاز متصل به دیواره سلولی است که مستقیما بر روی فیبرینوژن پلاسمای برخی از جانوران تاثیر می کند. در حالیکه کواگولاز آزاد بر روی پروترومبین اثر کرده و یک ماده ترومبین مانند بوجود می آورد همچنین مشخص شده است که این دو نوع کواگولاز از نظر آنتی ژنی با هم متفاوت می باشند.

- چگونگی عمل کواگولاز هنوز به درستی معلوم نیست آنچه به طور کلی پذیرفته شده این است که یک فاکتور پلاسما در واکنش شرکت می کنند و این ماده ی فعال کننده شبیه به پروتروبین می باشدبرای انجام آزمایش در روش وجود دارد :

1. روش لامی
2. روش لوله ای

مواد و وسایل مورد نیاز:

1. نمونه ماده ی غذایی (ماهی)
2. ترازو
3. دانه شیشه ای استریل (پریل)
4. دستگاه مخلوط کن
5. ارلن حاوی ۴۵۰ میلی لیتر محلول رینگر استریل
6. ارلن حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر استریل
7. لوله آزمایش حای ۹ میلی لیتر محلول رینگر استریل
8. محیط کشت گوشت پخته شده

1. محیط کشت بردپارکر آگار
2. محیط کشت آبگوشت مغذی
3. پلاسمای سیتراته خون انسان
4. پی پت استریل
5. لوله آزمایش استریل
6. لام توگود
7. سرم فیزیوژلوژیک استریل

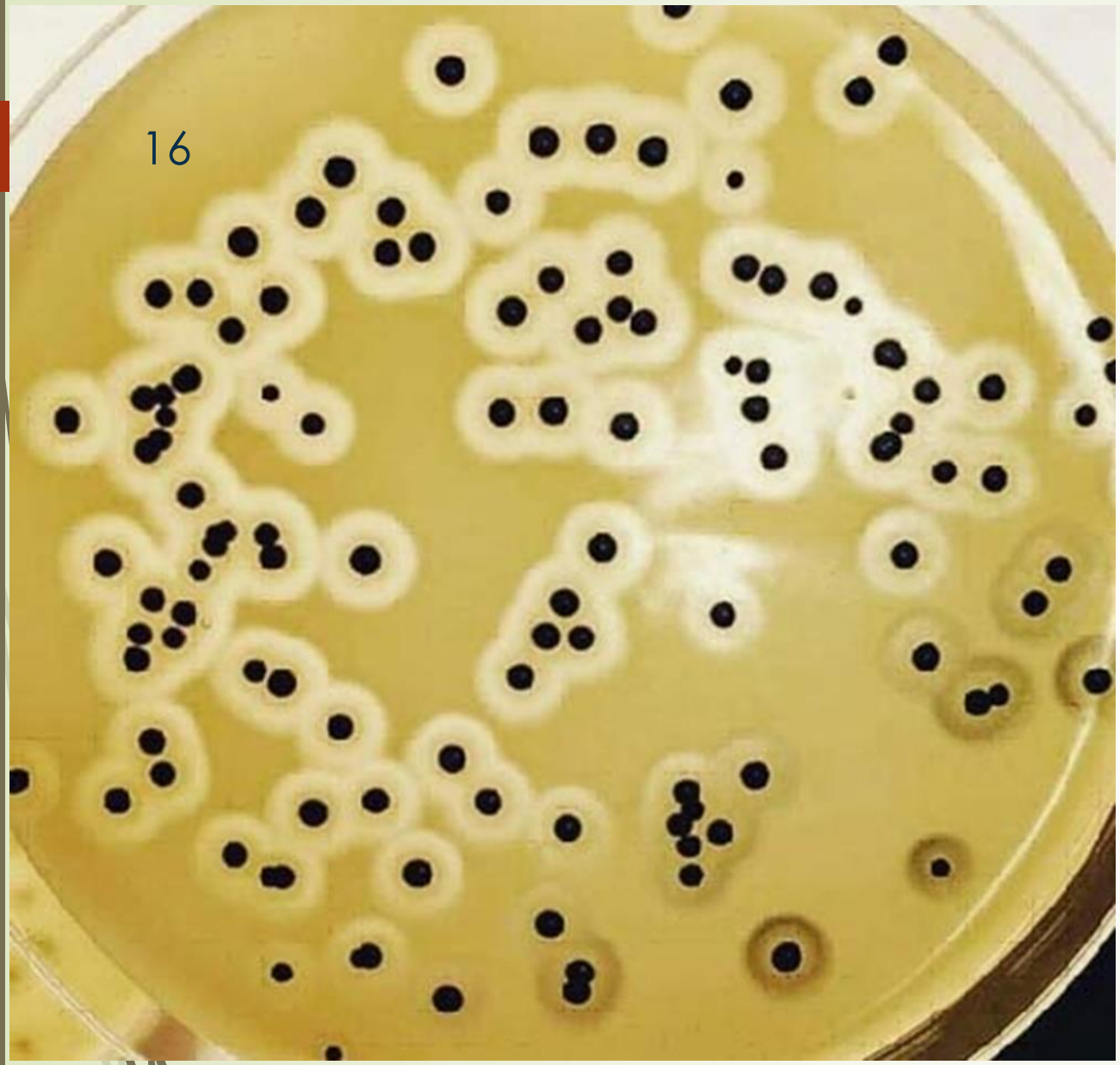
روش آزمایش:

- جهت انجام آزمایش در صورتی که نمونه ماهی بزرگ باشد در ابتدا باید پوست ماهی را با یک مته چوب پنبه ای سترون باید برداشت کرد و سپس شش تکه از بدن ماهی را جمع آوری کنید (سه تکه از قسمت شکمی و سه تکه از قسمت پشتی).
- تکه های گوشت را درست از قسمت زیر پوست با یک چاقوی سترون و پنس برداشت کنید. نمونه ی برداشت شده را در یک ظرف سترون توزین کرده و مقدار ۱۰ گرم از آن را به ارلن حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر اضافه کنید و به آن دانه های شیشه ای استریل (پرل) اضافه کنید و آن گاه نمونه ماده رقیق کننده را به مدت یک دقیقه بوسیله تکان دادن مخلوط کنید.
- بعد از مخلوط کردن نمونه اقدام به تهیه ی رقت های مناسب از آن (تا رقت 10^{-8}) در لوله های حاوی ۹ میلی لیتر محلول رینگر کرده و سپس نسبت به کشت مقدار ۱ میلی لیتر از رقت تهیه شده بر روی محیط کشت کوکدمیت و محیط کشت بردپارکرآگار انتقال دهید.

- جهت نمونه های گوشت ماهی ، فیله ماهی و یا ماهی های کوچک (کمتر از ۱۵ سانتی متر) نمونه ها را با رعایت شرایط سترون به اندازه های ۲/۵ سانتی متر مربع برش دهید.
- آن گاه مقدار ۵۰ گرم از گوشت یا نمونه حاصل را همراه با ۴۵۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده رینگر در یک ظرف سترون مخلوط کن افزوده و آن را به مدت دو دقیقه مخلوط کنید و در صورتی که نمونه کاملا به صورت یکنواخت مخلوط نشده است، بگذارید به مدت دو دقیقه بی حرکت بماند و سپس به مدت دو دقیقه ی دیگر مخلوط کنید.
- مطابق مراحل قبل اقدام به تهیه ی رقت های مناسب کرده و از رقت های حاصل بر روی محیط های کشت کوکدمیت و بردپارکر آگار کشت دهید.

- محیط کشت کوکدمیت ، حاوی جگر پخته شده است و همچنین این محیط کشت به میزان ۱۰ درصد حاوی کلروسدیم می باشد و با افزودن رقت های مناسب به داخل محیط کشت کوکدمیت حاوی نمک اولا باعث غنی کردن و ازدیاد باکتری های موجود در نمونه خواهد شد و ثانیا به علت وجود درصد بالایی از نمک می توان از رشد باکتری های به غیر از جنس استافیلو کوکس جلوگیری به عمل آورد.
- به علاوه محیط کشت کوکدمیت یک شرایط بی هوازی را نیز برای رشد باکتری بوجود می آورد و باکتری ها از طریق عمل احیا کنندگی گروه های SH پروتئین های جگر پخته شده که بیشتر در پروتئین های دناتوره شده موجود است یک شرایط مطلوب را برای رشد خود بوجود می آورند و به همین علت بعد از رشد باکتری ها در این محیط تکه های جگر موجود در داخل لوله محیط کشت بر اثر خاصیت پروتئولیتیک باکتری ها هضم خواهد شد.

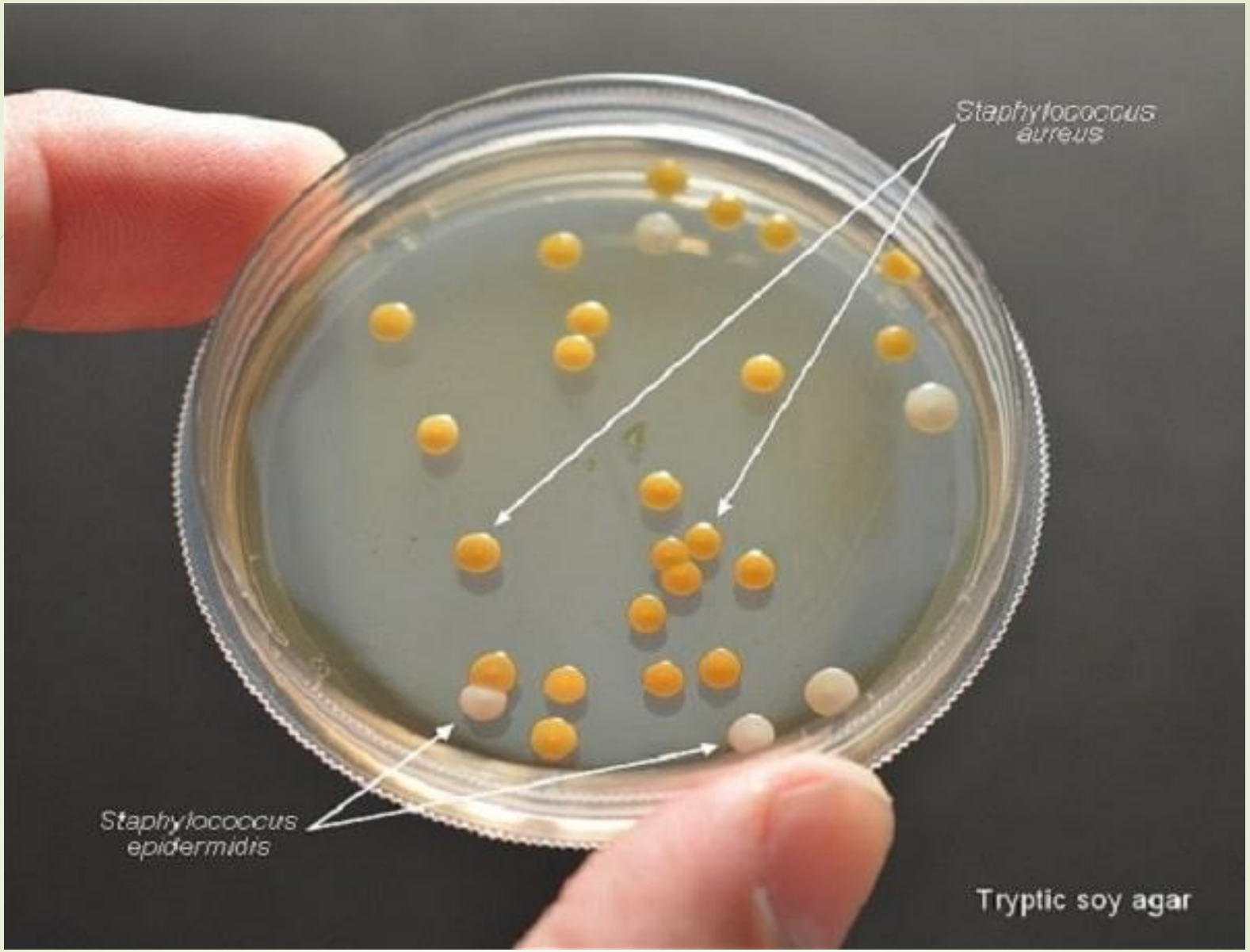
- در این آزمایش علاوه بر این که از رقت های تهیه شده به داخل محیط کوکدمیت انتقال خواهد داد ، مقدار یک میلی لیتر از نمونه را بر روی محیط کشت بردپارکر آگار نیز منتقل کنید و بوسیله میله شیشه ای سرکج نمونه اضافه شده را در سطح پتری دیش پخش کنید و بعد از جذب نمونه به داخل محیط کشت و قرار دادن پتری دیش مذکور در داخل گرمخانه (انکوباتر) ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت اقدام به شمارش پرگنه های باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* بر روی محیط فوق کنید. این محیط حاوی کلرورلیتیوم و تلوریت پتاسیم جهت مهار شدن رشد فلور میکروبی همراه می باشد. در حالیکه مواد دیگر موجود در این محیط کشت مانند پیروات و گلایسین به طور انتخابی رشد استافیلوکوک ها را تحریک می کند.
- کلنی های باکتری *استافیلوکوکوس* هنگامی که بر روی این محیط کدر (کدر به علت موجود بودن زرده تخم مرغ در داخل محیط کشت) رشد می کنند دو خصوصیت مشخص را نشان می دهد.
- الف) هاله ها و حلقه های مشخص در نتیجه عمل لیپولیز و پروتئولیز تشکیل خواهد شد (نشان دهنده ی عمل لیپاز باکتری *استافیلوکوک*).
- ب) احیای تلوریت به تلوریوم و ایجاد کلنی های به رنگ سیاه رنگ.



واکنش زرده تخم مرغ و احیاء تلوریت و در نتیجه ایجاد کلنی های سیاه رنگ با هاله شفاف در اطراف خود نشان دهنده رشد باکتری *استافیلوکوکوس* است.

بعد از شمارش کلنی های سیاهرنگ مقدار باکتری را در هر گرم از نمونه ماده غذایی حساب کنید.

برای اطمینان از جدا شدن باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* از ماده غذایی اقدام به انجام تست کواگولاز به هر دو روش لامی و لوله ای تست کواگولاز نمایید.



تهیه کننده : سهیلا عباسی

I. مواد و وسایل لازم جهت انجام آزمایش کواگولاز به روش لامی :

1. کشت ۲۴ ساعته *استافیلوکوکوس آرئوس* روی محیط نوترینت آگار
2. لام تمیز
3. سرم فیزیولوژیکی
4. پی پت پاستور استریل
5. پلاسمای خون انسان یا خرگوش

- روش انجام آزمایش :
- برای انجام این آزمایش یا از لام های توگود مخصوص این کار استفاده می کنیم و یا سطح لام را با مداد چرب روغنی به دو قسمت تقسیم کرده و سپس برای شروع کار ، ابتدا یک قطره سرم فیزیولوژیکی را بری روی لام قرار داده (این کار را بر روی دو لام به صورت جداگانه نیز می توانید انجام دهید) و سپس به کمک فیلد و پلاتین استریل یک کلنی از باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* را از روی محیط جدا کرده و بر روی قطره موجود در روی لام ها برده و آن ها را خوب مخلوط کنید.
- سپس بر روی یکی از لام ها به کمک پی پت پاستور یک قطره پلاسمای خون انسان یا خرگوش اضافه کرده و هر دو لام (لام دارای پلاسما و لام فاقد پلاسما) را به کمک دست و یا شیکر حرکت دورانی دهید تا سوسپانسون حاصل بر روی لام به خوبی مخلوط شود در صورتی که بعداز تکان دادن به مدت حدود یک دقیقه، حاصل بر روی لام واجد پلاسما به صورت گلوله گلوله (آگلوتینه شدن) درآمد تست کواگولاز مثبت خواهد بود که می توان آن را با مقایسه کردن با لام شاهد بررسی کنید. در صورتی که تست کواگولاز لامی منفی بود از یک تست کواگولاز لوله ای استفاده کنید.
- روش صحیح مخلوط کردن باکتری ها در آزمون آگلوتیناسیون بر روی اسلاید. اسلاید را تنها از لبه های بگیرید. با حرکاتی به سمت جلو و عقب اسلاید را تکان دهید . دقت کنید که مخلوط از دایره هایی که با مداد چرب رسم نموده اید خارج نشود.

I. مواد و وسایل لازم جهت انجام آزمایش کواگولاز به روش لوله ای :

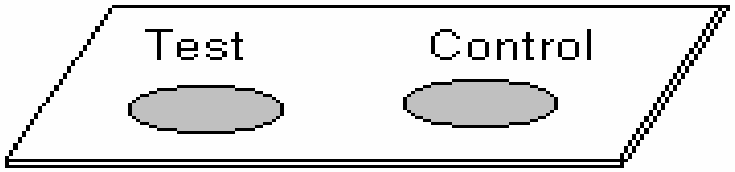
1. کشت ۲۴ ساعته استافیلوکوکوس آرئوس روی محیط کشت T.S.B
2. پلاسمای سیتراته (خون انسان یا خرگوش)
3. لوله آزمایش استریل
4. پی پت استریل

- روش انجام آزمایش :
- برای انجام این آزمایش ابتدا ۰/۱ میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته استافیلوکوکوس آرئوس را با (۰/۳الی ۰/۵) میلی لیتر پلاسمای رقیق شده به نسبت یک پنجم خون انسان یا خرگوش مخلوط کرده و لوله را به مدت ۱الی۴ ساعت در انکوباتور۳۷درجه سانتی گراد قرار می دهیم در طی ۱ تا۴ ساعت لوله را برسی می نمایید اگر در طی این مدت منعقد شد آزمایش مثبت است و در غیر این صورت برای گزارش منفی بودن آن باید تست را برای ۲۴ ساعت بعد ملاحظه کنند لوله را در دمای اتاق باید گذاشت.

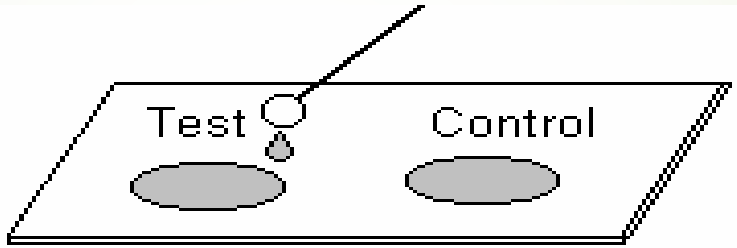
- پلاسما باید استریل باشد و در لوله استریل هم آزمایش انجام بشود و همچنین کشت باید خالص باشد. اگر از پلاسمای سازمان انتقال خون استفاده می شود نباید تاریخ آن گذشته باشد بهتر است از پلاسمای تازه آزمایش شود زیرا برخی از فاکتور های پلاسمای کهنه از بین می رود.
- در این آزمایش می توان از یک استافیلوکوک کواگولاز مثبت و منفی برای هر سری آزمایش استفاده کرد.
- در موارد فوری می توان مستقیما از پرگنه های استافیلوکوک که در روی محیط های اختصاصی ظاهر می شوند برداشت نموده در لوله حاوی پلاسمای رقیق شده برد.
- معمولا پلاسما را به نسبت ۱.۱ با سرم فیزیولوژیک یا آبگوشت غذایی یا سایر رقیق کننده ها مخلوط می کنند.

- Slide coagulase test

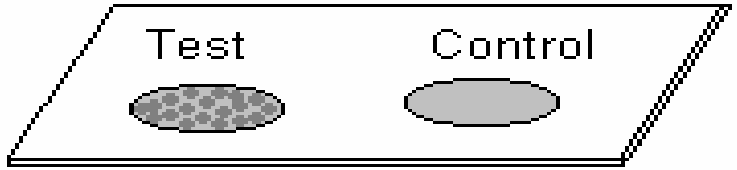
Coagulase



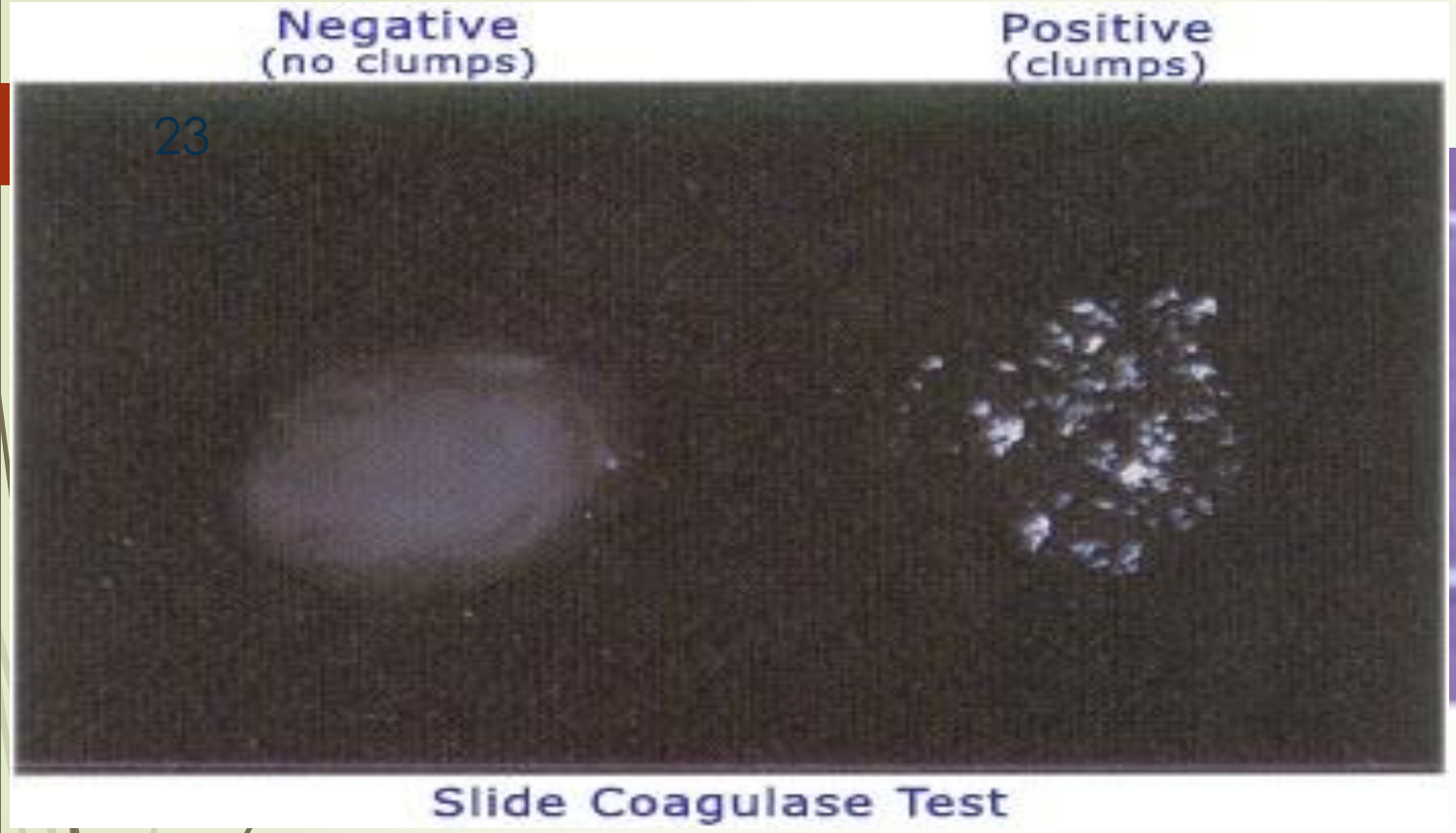
Dense suspensions of test are made on slide



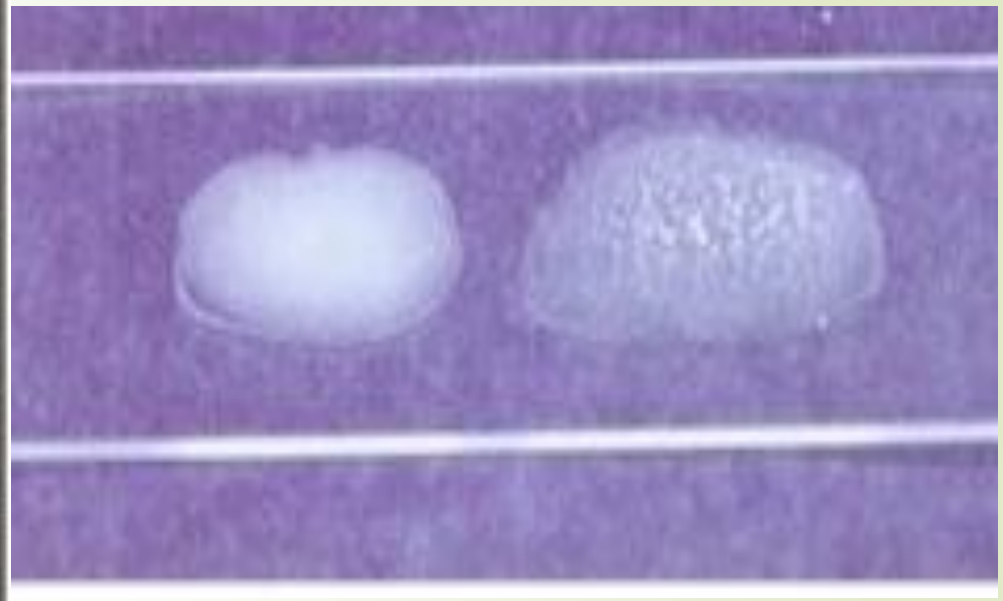
One loopful of plasma is added to test and mixed



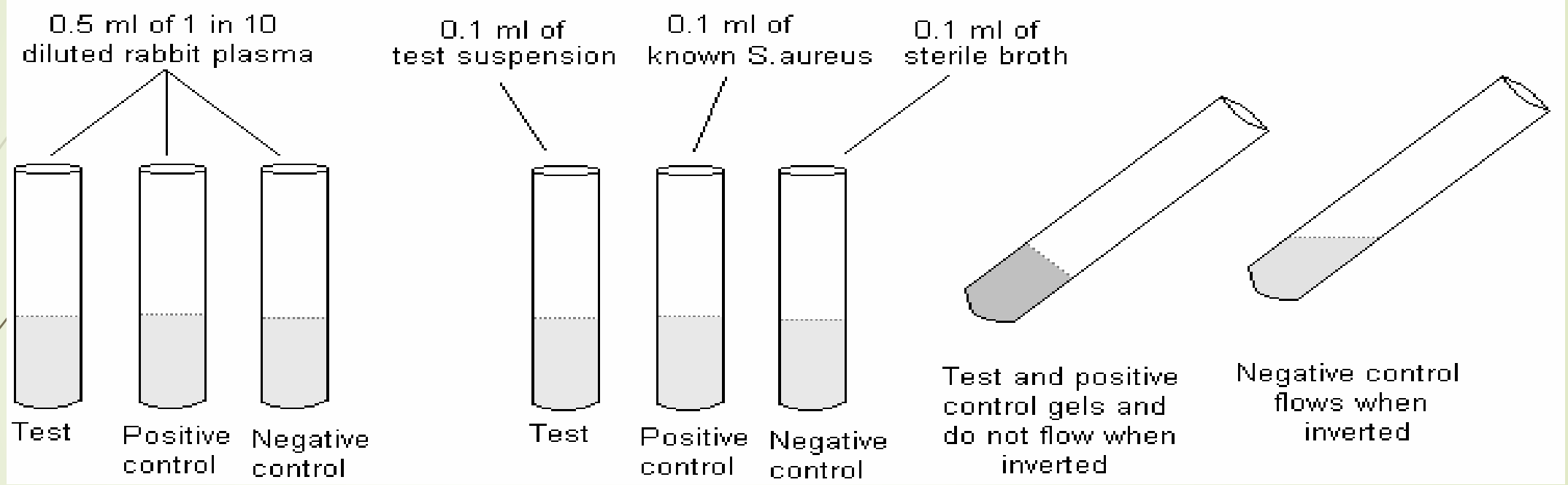
Clumping occurs in test, indicating it is S.aureus



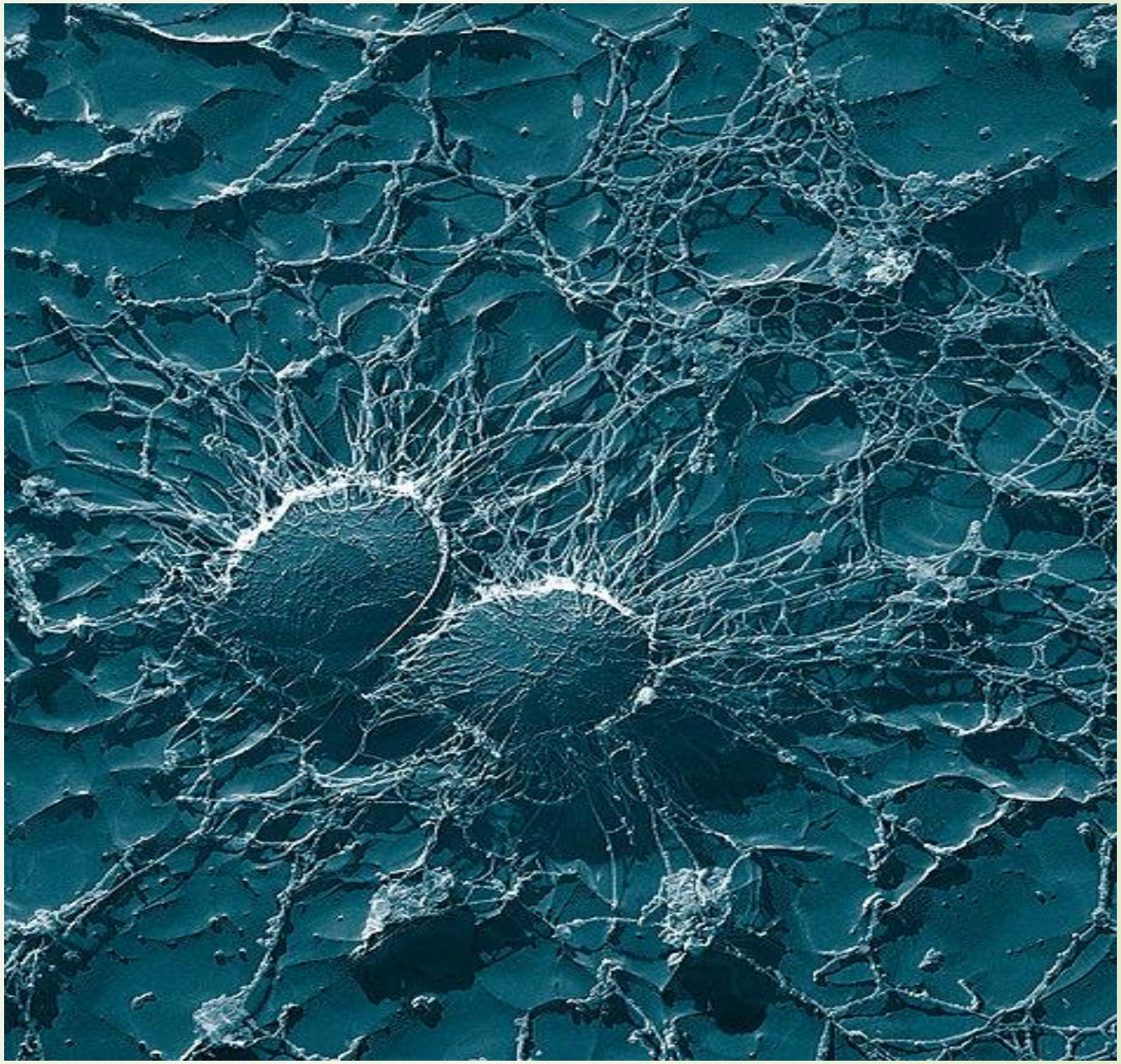
Slide Coagulase Test



TUBE COAGULASE TEST

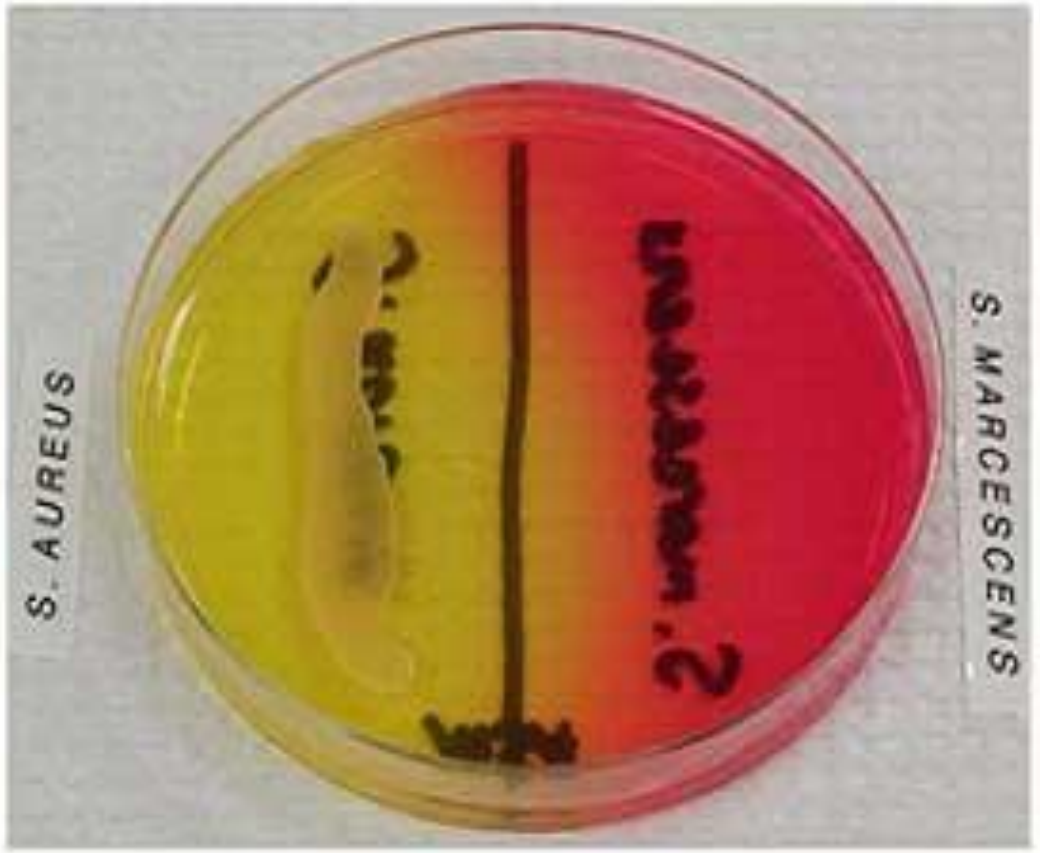


- Clumping by bound coagulase

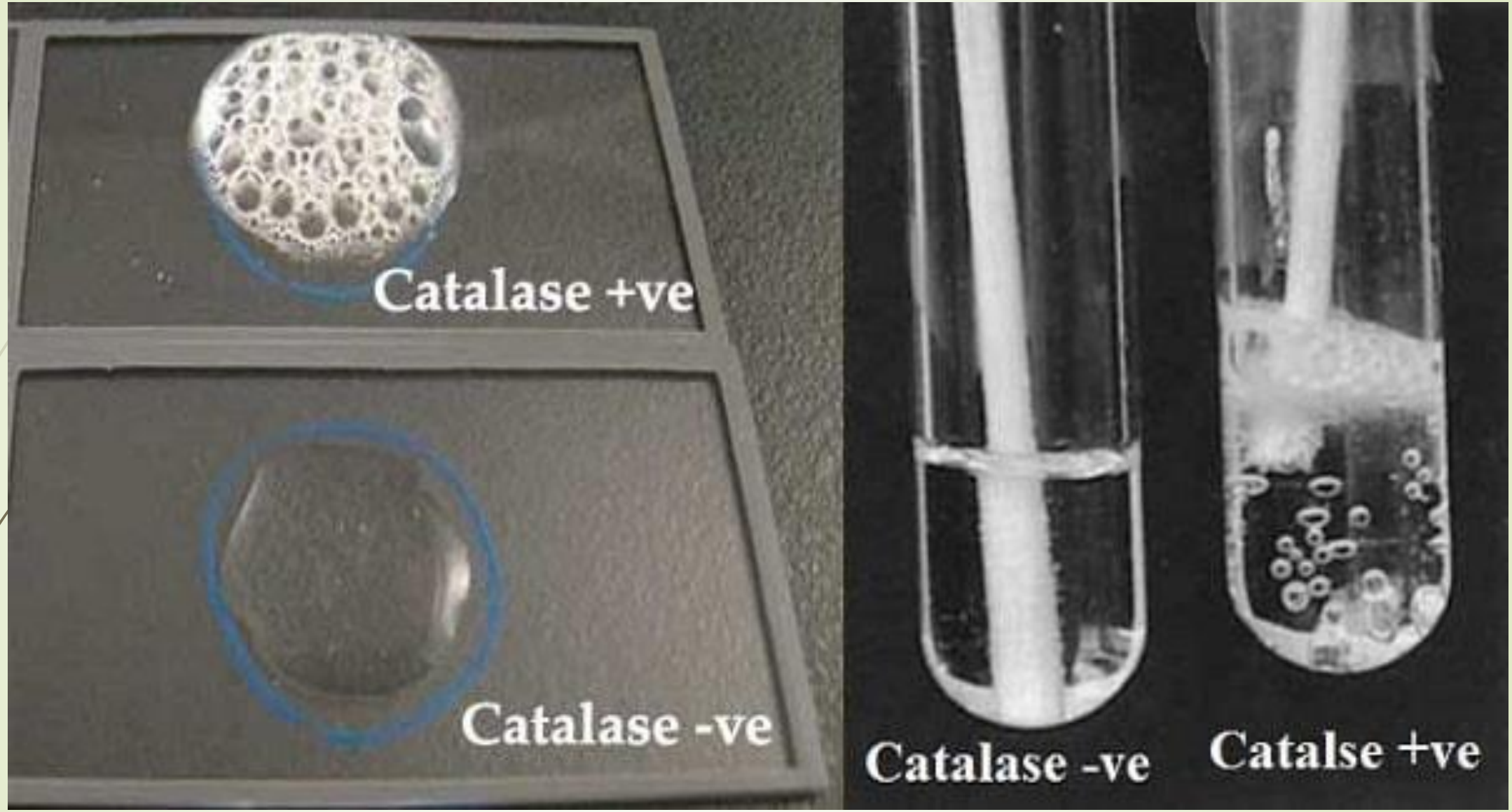


Mannitol Salt Agar (MSA) for the isolation of *Staphylococcus aureus*

Yellow colonies of *Staphylococcus aureus*



Staphylococcus aureus and *Serratia marcescens* on MSA


Catalase +ve
Catalase -ve
Catalase -ve
Catalse +ve

Catalase Positive
Catalase Negative

Staphylococcus aureus

Thank you
for
listening!