به نام خدا

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی ،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه باکتری شناسی ۲

آشنایی با روش نمونه‌گیری از مدفوع به منظور جداسازی اشریشیا کلای ساکن در روده و جداسازی و خالص سازی کوکوباسیل های گرم منفی مشکوک به اشریشیا کلای، کلبسیلا، انتروباکتر و پروتئوس از نمونه مدفوع

تهیه‌کننده: سهیلا عباسی

COLLECTION

- Universal Precautions
- Stool should be collected in a dry, sterilized, wide mouthed container.
- It should be uncontaminated with Urine or any other body secretions.
- Properly named and always a fresh sample should be tested.

Types of Examination

- **PHYSICAL EXAMINATION**: colour, volume, consistency, odour, mucus, pus, concreations, helminths.
- **CHEMICAL EXAMINATION**: reactions, occult blood, fat, carbohydrate, protein, etc
- **MICROSCOPIC EXAMINATION**: remnants of food, pus cells, macrophages, RBCs, crystals, bacteria, yeasts, molds, protozoa, helminths.
- **STOOL CULTURE:**

COLOUR OF FECES-in Infants

Exclusively breast fed infants pass loose and green or pasty and yellow stools.

Infants fed on cows' milk preparations pass stools of a paler yellow colour and of a much firmer consistency.

Babies fed on newer modified cows' milk preparations have clay coloured or greenish stools.

Some healthy children may pass frequent, loose stools containing undigested vegetable matter called as Toddler's diarrhoea.

CONSISTENCY OF STOOL

Type 1		Separate hard lumps, like nuts (hard to pass).
Type 2		Sausage-shaped but lumpy.
Type 3		Like a sausage but with cracks on the surface.
Type 4		Like a sausage or snake, smooth and soft.
Type 5		Soft blobs with clear-cut edges.
Type 6		Fluffy pieces with ragged edges.
Type 7		Watery, no solid pieces. Entirely Liquid.

SLIDE PREPARATION

SLIDES
- Saline Specimen Prpn.
- Iodine Specimen Prpn.

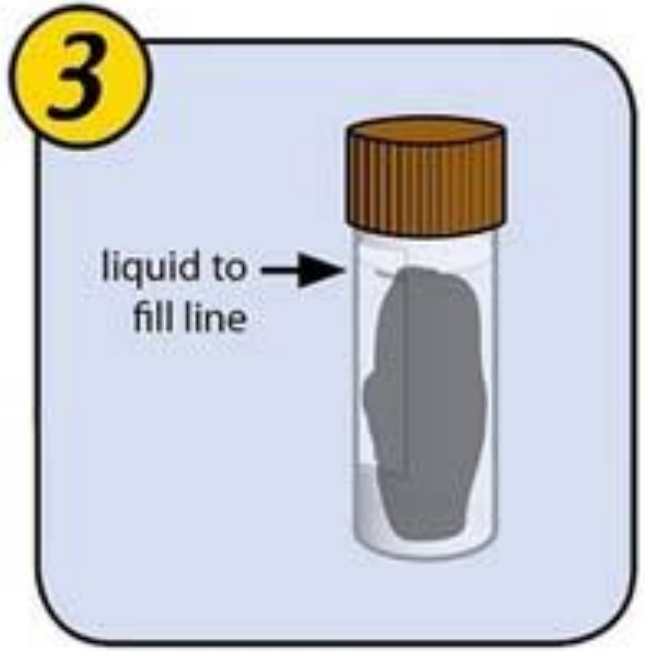
CONCENTRATION METHOD to detect Ova.

- A drop of warm Saline or Lugol's Iodine is placed over a clean microscopic slide.
- About 2mg of stool sample should be taken and mixed with soln placed over the slide.
- Coverslip is placed avoiding air bubbles.
- Examined under Microscope.

Stool Sample Collection and Transport

Collect on plastic wrap and transfer to vial until liquid reaches fill line.

Remove spoon from lid and discard.



Replace cap on vial tightly and shake for a minute. Place vial in refigerator until ready to ship.

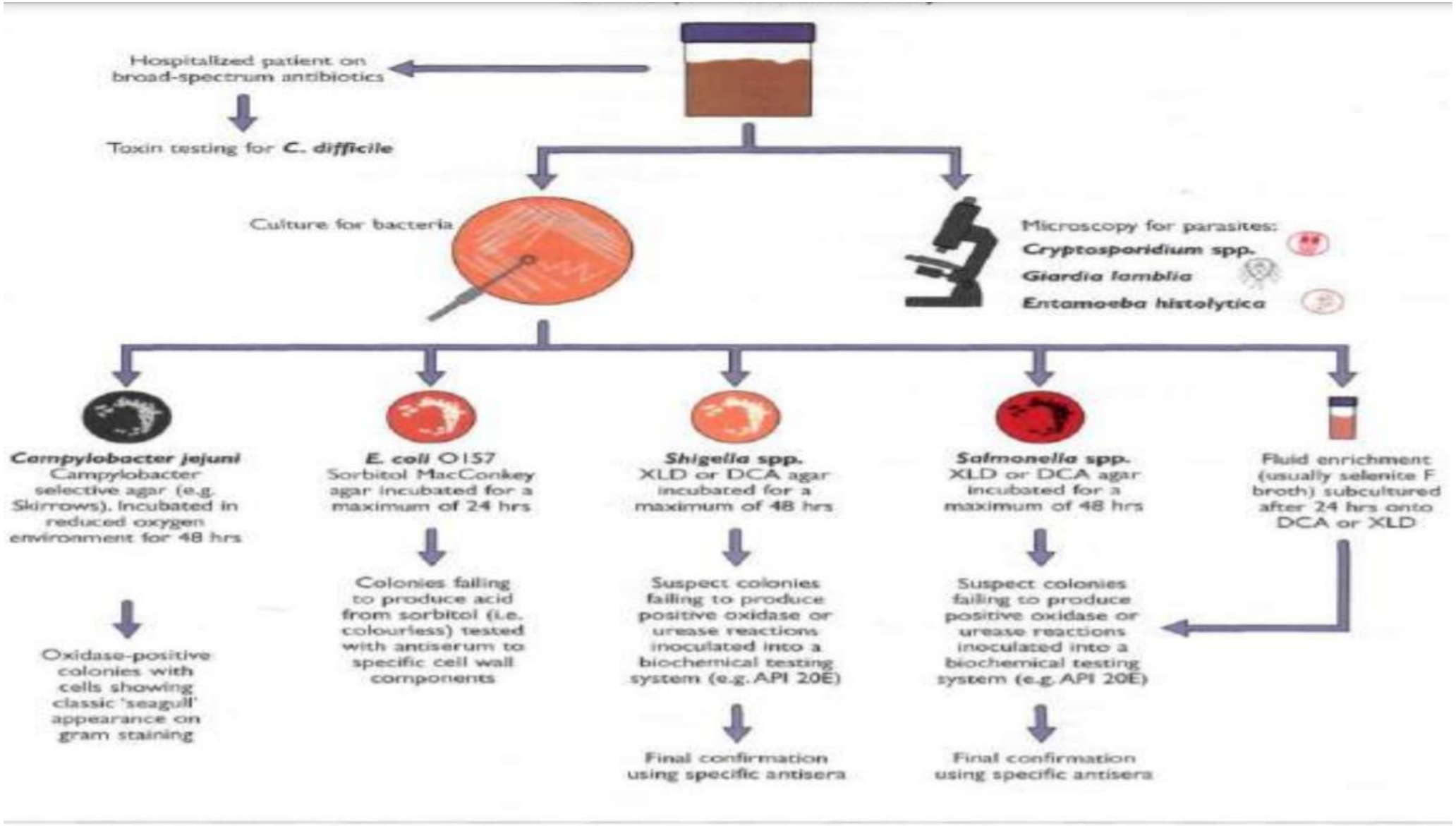
STOOL CULTURE

Normal Microbial flora of GI tract contains following organisms.

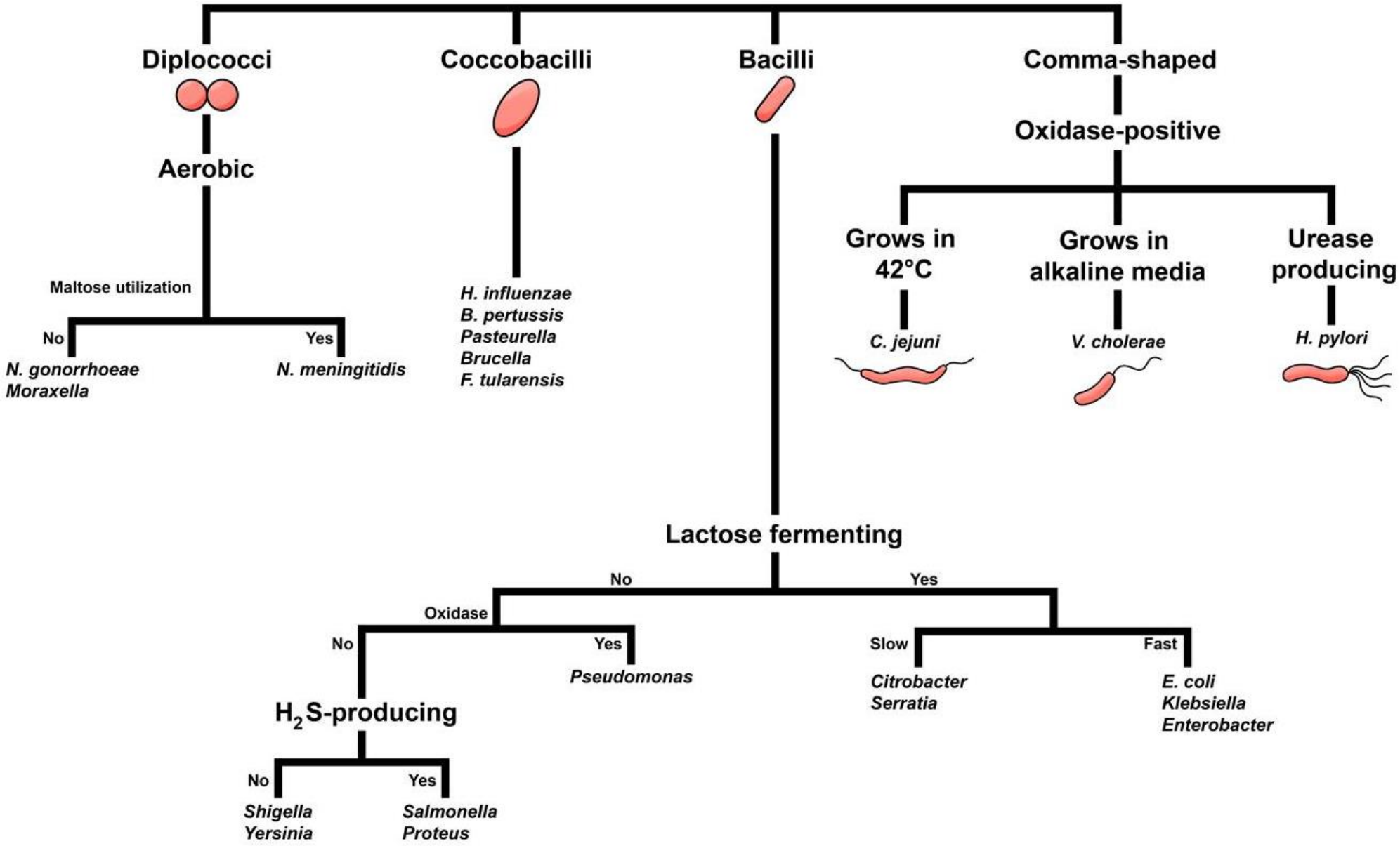
Gram –ve - E. coli, Enterobacter, Proteus, Pseudomonas aeruginosa, Bacteroides.

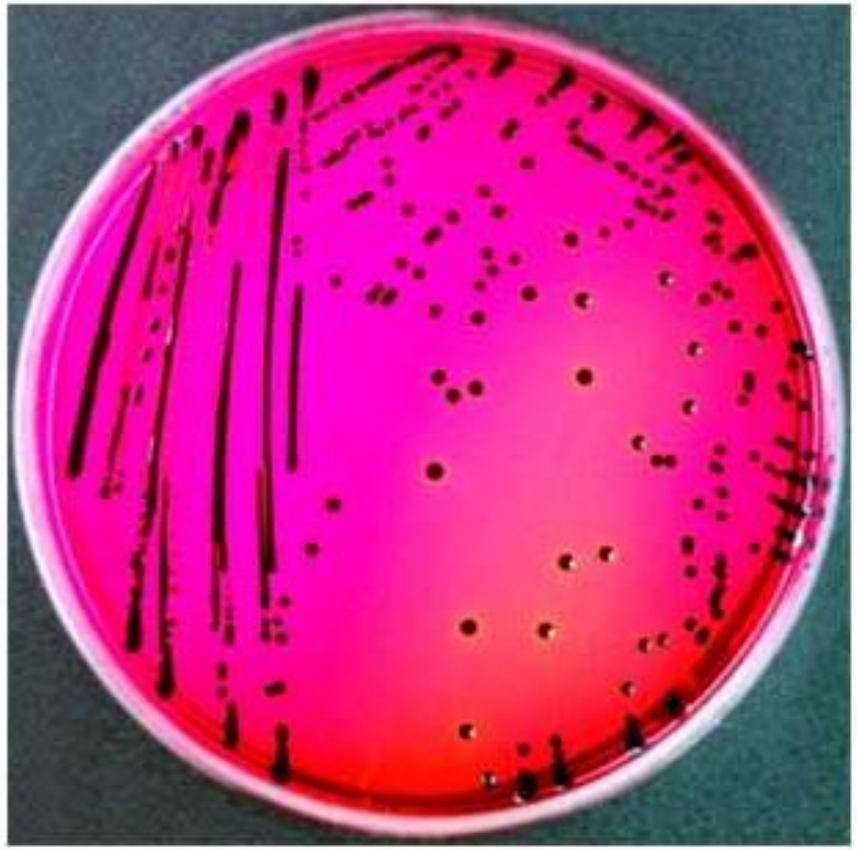
Gram +ve - Clostridia, Lactobacilli, Enterococci, Anaerobic streptococci.

Human feces contain approximately 10^{11} organisms per gram wet weight as normal flora. Whereas gut bacterial pathogens rarely exceed 10^{5} organisms per gram.


Hospitalized patient on broad-spectrum antibiotics
Toxin testing for C. difficile
Culture for bacteria
Microscopy for parasites:
Cryptosporidium spp.
Giardia lamblia
Entamoeba histolytica
Campylobacter jejuni
Campylobacter selective agar (e.g. Skirrows). Incubated in reduced oxygen environment for 48 hrs
Oxidase-positive colonies with cells showing classic 'seagull' appearance on gram staining
E. coli O157
Sorbitol MacConkey agar incubated for a maximum of 24 hrs
Colonies failing to produce acid from sorbitol (i.e. colourless) tested with antiserum to specific cell wall components
Shigella spp.
XLD or DCA agar incubated for a maximum of 48 hrs
Suspect colonies failing to produce positive oxidase or urease reactions inoculated into a biochemical testing system (e.g. API 20E)
Final confirmation using specific antisera
Salmonella spp.
XLD or DCA agar incubated for a maximum of 48 hrs
Suspect colonies failing to produce positive oxidase or urease reactions inoculated into a biochemical testing system (e.g. API 20E)
Final confirmation using specific antisera
Fluid enrichment (usually selenite F broth) subcultured after 24 hrs onto DCA or XLD

Gram-Negative Bacteria





Salmonella on XLD.

Selenite-F broth

- **Selenite Broth** (Selenite-F Broth)
  used as an enrichment medium for the isolation of Salmonella from feces, urine, water, foods and other materials of sanitary importance.
- **Sodium selenite** inhibits the growth of gram-positive and many gram-negative bacteria including enterococci and coliforms, whereas the salmonellae are not affected.

Selective media commonly used to recover Enteropathogen

CULTURE MEDIA	Purpose	Pathogens
Mac Conkey agar	To recover *Enterobacteriaceae* and other fastidious Gram negative organisms	Salmonella, shigella (NLF)
Hektoen enteric agar (HE)	A highly selective media to recover salmonella, shigella, contain indicator to detect H2S production	*Salmonella* :blue green with black centre *Shigella* green without black centre
Xylose-lysine deoxy cholate (XLD)	A differntial media for isolation of *shigella and salmonella* from stool	*Salmonella*: red with black centre *Shigella*: red or clear
Campylobacter blood agar (CAMPY-BA)	Selective media to isolate campylobacter from stool	Appears pink grey moist when incubated at 42°C

Selective media commonly used to recover diarrheal agents

CULTURE MEDIA	Purpose	Pathogens
Thiosulphate bile salt sucrose agar (TCBS)	*Vibrio species* *Aeromonas* species	Yellow colonies; sucrose fementing vibrio sp. Such as V. cholera Blue green colonies: non sucrose fermenters as V. vulnificus, parahaemolyticus
Cycloserine cefoxitin fructose agar (CCFA)	selective media for clostridium difficle	Appeasrs yellow from fructose fermentation
Sorbitol macconkey agar (SMAC)	A differntial media to detect sorbitol negative E.coli (contain sorbitol instead of lactose)	*E.coli* O157: H7 apear colorless

I. نمونه SPECIMEN :

- **الف) مدفوع تازه جمع آوری شده در یک ظرف تمیز پلاستیکی در دار**

۱- نمونه بایستی در مدت ۳۰ دقیقه (جهت گونه های شیگلا) و حداکثر ظرف مدت ۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفته و کشت داده شود.در صورت پیش بینی تاخیر (بیش از ۲ ساعت) نمونه باید به محیط ترانسپورت مناسب منتقل گردد.

* در مورد شیگلاها یخچال گذاری نمونه ها حداکثر تا ۲ ساعت پس از نمونه گیری توصیه می شود.همچنین می توان از رکتال سواب قرار داده شده در یک محیط براث جهت انتقال نمونه ها استفاده کرد.

۲- حداقل یک گرم مدفوع تازه با قوام طبیعی (به اندازه یک فندق) و یا ۵ گرم مدفوع اسهالی جهت کشت مورد نیاز می باشد.

* از مخلوط شدن نمونه های مدفوع با ادرار خودداری شود.

* در بیمارانی که بیش از ۳ روز در بیمارستان بستری بوده اند ، کشت روتین مدفوع توصیه نمی شود.

۳- بررسی ماکروسکوپی و مشاهده مستقیم مدفوع از نظر قوام ، لخته خون ، چرک ، موکوس و.... و گزارش آن.

۴- انجام آزمایشات غربالگری مانند :

- تهیه اسمیر نازک از مدفوع و رنگ آمیزی گرم ، رایت و یا بلودومتیلن جهت بررسی و شمارش WBC های مدفوع و همچنین مشاهده مرفوتایپ غالب، وجود سلولهای مخمری یا عدم حضور باسیلهای گرم منفی روده ای.

- تست لاتکس آگلوتیناسیون جهت لاکتوفرین (محصول ناشی از تخریب WBC های مدفوع در موارد نگهداری طولانی مدت).

- **ب) رکتال سواب (سواب مقعدی)**

* جهت جلوگیری از خشک شدن نمونه ، رکتال سواب را بایستی در محیط براث و یا محیط ترانسپورت مناسب نگهداری نموده و انتقال داد.

- **ج) مدفوع نگهداری شده در محیط ترانسپورت**

محیط ترانسپورت کاری بلر (Cary-Blair) محیط مناسب جهت نگهداری و انتقال مدفوع می باشد.در این محیط شیگلاها قادرند حدود ۵۰ روز و سالمونلاها ۶۰-۴۵ روز زنده بمانند.

* برخی از محیط های ترانسپورت خاص مانند آب پپتونه قلیایی (Alkaline peptone water) جهت ایزولاسیون ویبریوها توصیه می شود.

II. تلقیح و انکوباسیون محیط های کشت

(INOCULATION AND INCUBATION OF MEDIA) :

- **الف) انتخاب محیط های کشت**

تعدادی از محیط های کشت ضروری جهت ایزولاسیون اولیه پاتوژنهای شایع روده ای ، شامل موارد زیر می باشند :

۱- **BAP** (آگار خوندار) به عنوان محیط غیر اختصاصی : این محیط جهت بررسی رشد استافیلوکوک اورئوس و مخمرها به کار می رود که در صورت مشاهده رشد قابل توجه ، بایستی این موارد را گزارش نمود ، اما انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی لازم نمی باشد.همچنین از این محیط می توان جهت انجام تست اکسیداز استفاده نمود و در صورت مشاهده واکنش مثبت ، بایستی مشکوک به آئروموناس ، ویبریوکلرا یا پلزیوموناس گردیده و اقدامات تشخیصی لازم را انجام داد.

۲- **MAC** (مکانکی آگار) یا **EMB** (ائوزین متیلن بلو) به عنوان محیط افتراقی جهت کمک به رشد باکتریهای گرم منفی روده ای

۳- **HE** (هکتون انتریک آگار) یا **XLD** (گزیلوز لیزین دزوکسی کولات) به عنوان محیط انتخابی و افتراقی جهت جداسازی سالمونلا و شیگلا.

۴- **Campy-blood agar** جهت کشت گونه های کمپیلوباکتر.

۵- **SMAC** (مکانکی- سوربیتول آگار) توسط برخی از مراجع بهداشت عمومی جهت کشت Escherichia coli O157:H7 توصیه می گـردد ، که در مورد نمونه های مدفوع حاوی خون و یا در صورت درخواست پزشک ، بایستی مورد استفاده قرار گیرد.

* چنانچه مشکوک به ویبریو ، آئرومونـاس و یا پلزیومونـاس شیگلوئیدس باشیم و یا در صورت درخواست پزشک ، محیط های کشت اختصاصی جهت جـدا سازی و شناسایی این میکروارگانیسم ها (مثل TCBS و...) لازم است.

ب) محیط های مایع مغذی Enrichment Broth

این محیط ها به منظور بازیافت مقادیر کم سالمونلا ، شیگلا یا کمپیلوباکتر در افراد بدون علامت ناقل عامل بیماری (کریرها) و بویژه در میان کارکنان دارای مشاغل حساس مانند افراد شاغل در مهد کودکها ، آشپزخانه ها و.... به کار می روند که شایعترین آنها GN براث و سلنیت براث (SF) می باشند.در مورد محیط GN براث ۶-۴ ساعت انکوباسیون در C ۳۷-۳۵ و برای محیط سلنیت براث ۱۲-۸ ساعت انکوباسیون در C ۳۷-۳۵ توصیه می گردد.

انکوباسیون طولانی مدت (بیشتر از زمان توصیه شده) در محیط های براث مغذی ، باعث افزایش رشد باکتریهای نان پاتوژن روده ای می شود.پس از طی مدت زمان لازم جهت انکوباسیون ، بایستی از محیط براث بر روی محیط های انتخابی و یا افتراقی نامبرده ، کشت مجدد نمود.

ج) محیط های کشت اختصاصی :

جهت ایزولاسیون سایر پاتوژن های روده ای بر حسب شیوع بیماری و یا با توجه به الزامات بهداشت عمومی و یا درخواست پزشکان ، محیط های زیر پیشنهاد می گردد :

SMAC (جهت اشریشیاکلی O157:H7) ، CIN (جهت یرسینیا انتروکولیتیکا) ، TCBS (جهت گونه های ویبریو) ، SS (جهت گونه های سالمونلا) ، Bismuth sulfite ager . Brilliant green agar (جهت گونه های سالمونلا) و Inositol-brilliant green bile salts agar (جهت پلزیوموناس شیگلوئیدس).

تذکر : محیط SS (Salmonella-Shigella agar) جهت برخی از گونه های شیگلا دارای اثر مهاری بوده و لذا بهتر است در موارد مشکوک به شیگلا ، مورد استفاده قرار نگیرد.

- **د)تلقیح به محیط کشت :**

یک سواب را به نمونه آغشته کرده و در قسمت کوچکی از پلیت کاملاً می چرخانیم. سپس با لوپ استریل نمونه را در تمامی پلیت Streak می نماییم تا کلنی های ایزوله بدست آوردیم.هنگام استفاده از محیط های نیمه انتخابی و یا کاملاً انتخابی بایستی مقدار زیادی از نمونه ها را تلقیح و کشت داد.

- **ه) انکوباسیون :**

* پلیت ها را به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور C ۳۷-۳۵ قرار می دهیم.

* در موارد خاص مانند ایزولاسیون کمپیلوباکترها ، محیط کشت را بایستی تحت شرایط میکروآئروبیک ($5\% O_2$) حداقل ۷۲ ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد انکوبه نمود.انکوباسیون در C ۴۲ مانع از رشد باکتریها می گردد، در حالیکه کمپیلوباکترهای پاتوژن قادر به رشد در C ۳۷-۳۵ نیز می باشند.

III گزارش نتایج (REPORTING OF RESULTS) :

۱- در موارد کشت مثبت (Positive Culture)

* گزارش باکتری جدا شده به صورت نیمه کیفی (Light,Moderate,Heavy) پس از شناسایی کامل میکروارگانیسم در حد جنس و گونه

* انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی و گزارش نتایج آن

۲- در موارد کشت منفی (Negative Culture)

به این طریق گزارش نمایید :

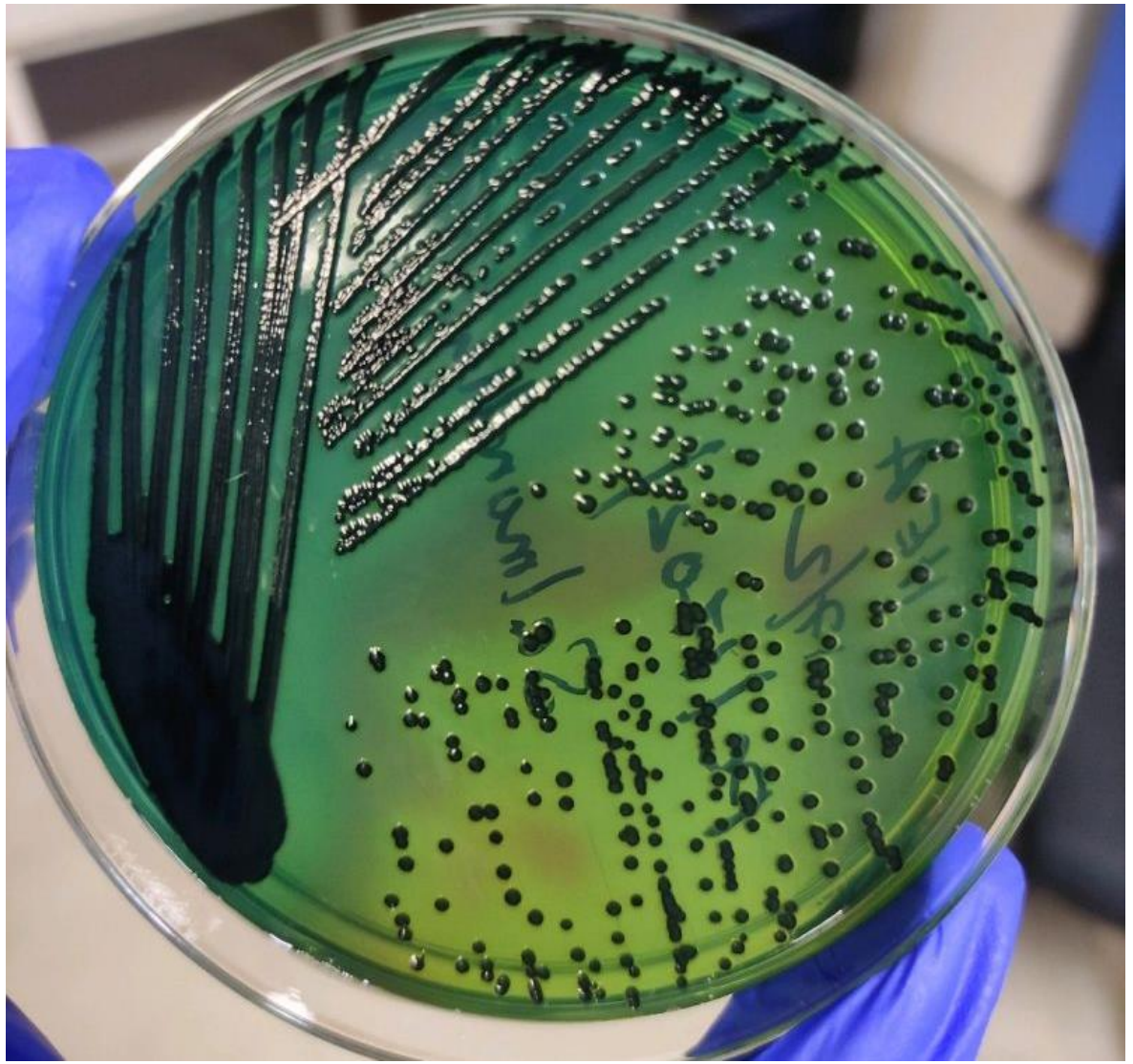
"No Salmonella ,Shigella,Vibrio,Campylobacter .....isolated."

در صورت عدم مشاهده میکروارگانیسم های روده ای در کنار جمله ای مانند :

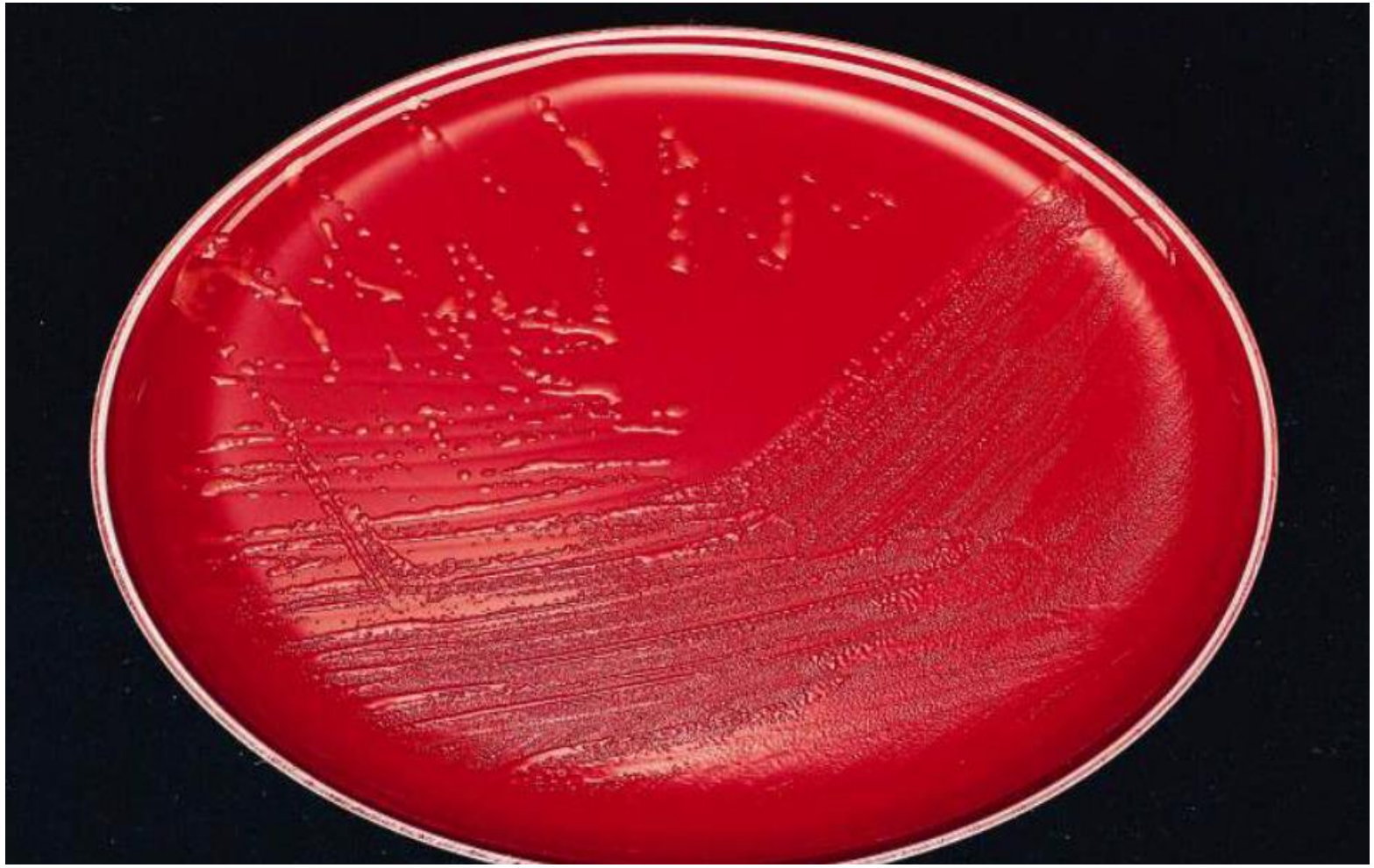
"Decreased of absent usual enteric gram-negative microbiota."

بایستی میکروارگانیسم غالب (چنانچه یکی باشد) را گزارش نمود.

Salmonella colonies on Hektoen enteric agar



Campylobacter colonies on campy blood agar



Stool Specimen

Inoculuate onto

Sorbitol MacConkey Agar

Incubate for 24 hrs at 37 oC.

Pick up non sorbitol fermenting colonies

Perofrm latex agglutination using O157 and H7 antiserum

Stool for Salmonella & Shigella

Selenite-F Broth

XLD

XLD

Pick up suspect colonies and perform biochemical test and serology if necessary

Stool

TCBS

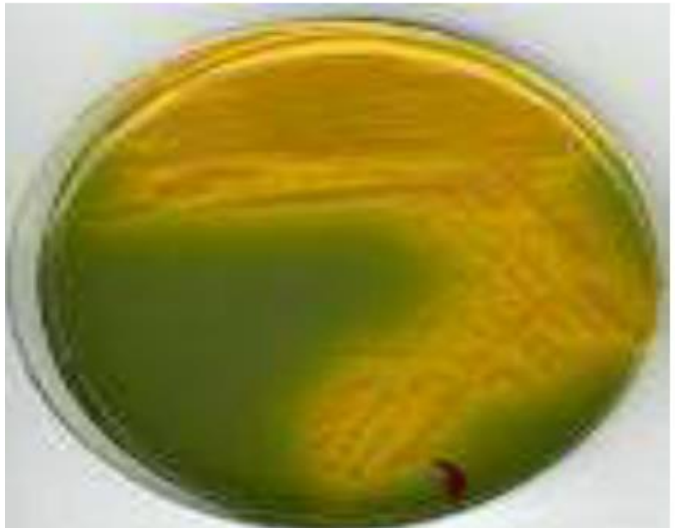
Alkaline peptone water

Incubate for 24 hrs at 37 oC

Incubate for 6-8 hrs at 37 oC

subculture onto TCBS

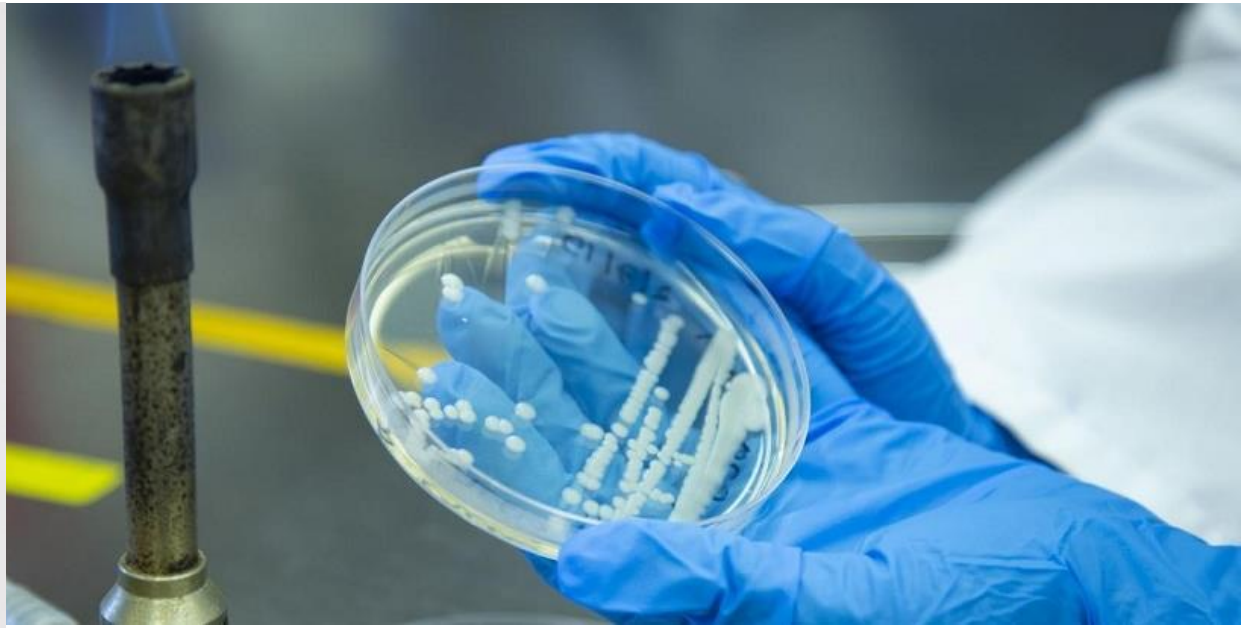
Incubate for 24 hrs at 37 oC



راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

- **روش کلاسیک:**

این روش شامل ۲ مرحله کشت و سرولوژی می‌باشد که هر دو به صورت همزمان توسط دو گروه کارشناس به طور مجزا انجام می‌گیرد و نتایج حاصل از این دو روش در نهایت می‌تواند منجر به شناسایی سروتیپ خاص موجود در نمونه گردد .



راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

الف) کشت:

در مجموع برای هیچ یک از پاتوتایپ‌های اشریشیاکلای محیط کشت اختصاصی وجود ندارد و باید ترکیبی از روش‌های کلاسیک، سرولوژی و مولکولی را برای شناسایی آنها استفاده نموده لذا جهت تشخیص اینگونه سویه‌ها اطلاعات موجود بیمار از قبیل سن بیمار ، نوع اسهال و علائم کلینیکی بیمار می‌توانند به عنوان عوامل کمکی در تشخیص استفاده شوند. در کنار این اطلاعات رشد یکدست و غالب اشریشیا کلای در محیط مکانکی به صورت کلنی‌های صورتی رنگ حائز اهمیت می‌باشد. (درغیاب پاتوژن‌های شناخته‌شده مانند سالمونلا ، شیگلا ...).

راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

الف) کشت:

مراحل کشت : ابتدا از روی نمونه مدفوع (موجود در محیط ترانسپورت) بر روی محیط‌های مک‌کانکی، بلاد، EMB ، سوربیتول مک‌کانکی، CT-SMAC، وکنگورد کشت می‌دهیم .. تعداد ۵ کلنی لاکتوز مثبت و ۲ کلنی لاکتوز منفی از روی محیط مکانکی انتخاب کرده و هر کدام را جداگانه بر روی TSI کشت می‌دهیم سپس محیط را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه می‌گذاریم پس از ۲۴ ساعت نتایج کشت را بررسی کرده و از روی محیط TSI بر روی محیط‌های افتراقی جهت تشخیص افتراقی کشت می‌دهیم.

روی محیط نوترینت‌آگار جهت سرولوژی کشت می‌دهیم و نتایج را بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه مشاهده می‌کنیم.

راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

ب) سرولوژی:

این روش به همراه کشت از محیط نوترینت آگار برای تشخیص آنتی ژن های O و H و تعیین سروتیپ های مختلف موجود در سویه های اشریشیاکلی انجام می گیرد. هر سویه دارای آنتی ژن های سوماتیک (O) و آنتی ژن های تاژکی (H) خاصی می باشند. در این روش سویه ها توسط آنتی سرم های تجارتی O و H شناسایی می شوند.

راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

۲-۳-۲) روش مولکولی:

انجام تست های مولکولی مانند PCR و هیبریداسیون از طریق روش های استاندارد صورت می پذیرد. انجام PCR برای تشخیص مولکولی پاتوتایپ های اشریشیا کلی در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی راه اندازی شده است و تشخیص سویه های مشکوک با کمک روش های مولکولی قابل انجام می باشد. آزمایش PCR توسط پرایمرهای خاص که برای ژن های ویرولانس طراحی شده اند بر روی DNA هایی که از سویه های مورد نظر جدا شده اند صورت می پذیرد.

راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

۳-۳-۲) روش کشت سلولی:

این روش به دو منظور صورت می گیرد:

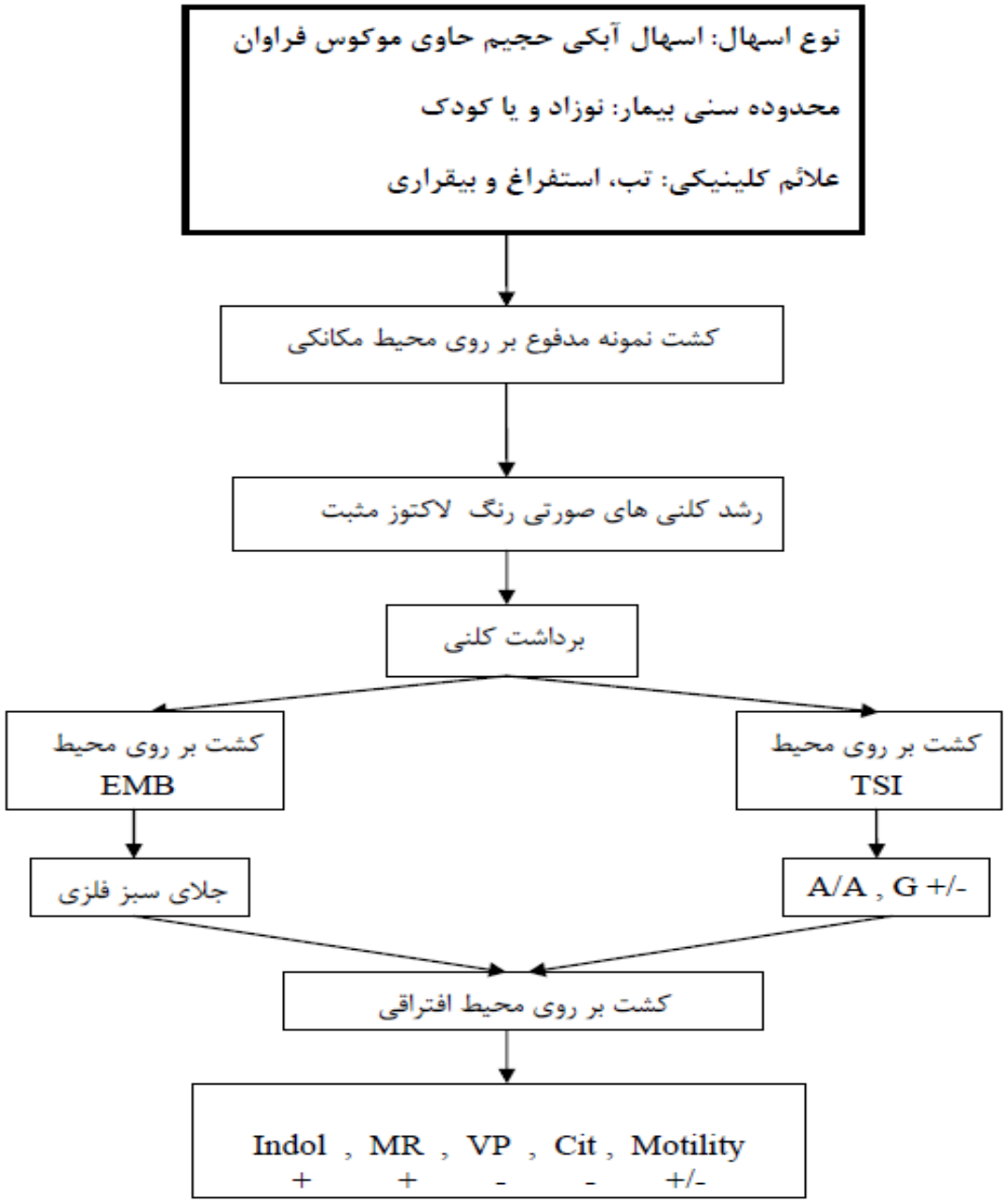
- تعیین الگوی چسبندگی سویه باکتری به سلول های اپی تلیال HEP-2 یا HeLa
- تشخیص نوع توکسین تولید شده توسط سویه های اشریشیاکلی به کمک سلول های فیبروبلاست مانند سلول های Vero و یا CHO انجام این تست در تمامی آزمایشگاه ها به علت نبود امکانات و پرسنل متخصص امکان پذیر نمی باشد ولی این روش در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیا کلی راه اندازی شده و سویه های مورد مطالعه می توانند از این نظر مورد بررسی قرار گیرند.

راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

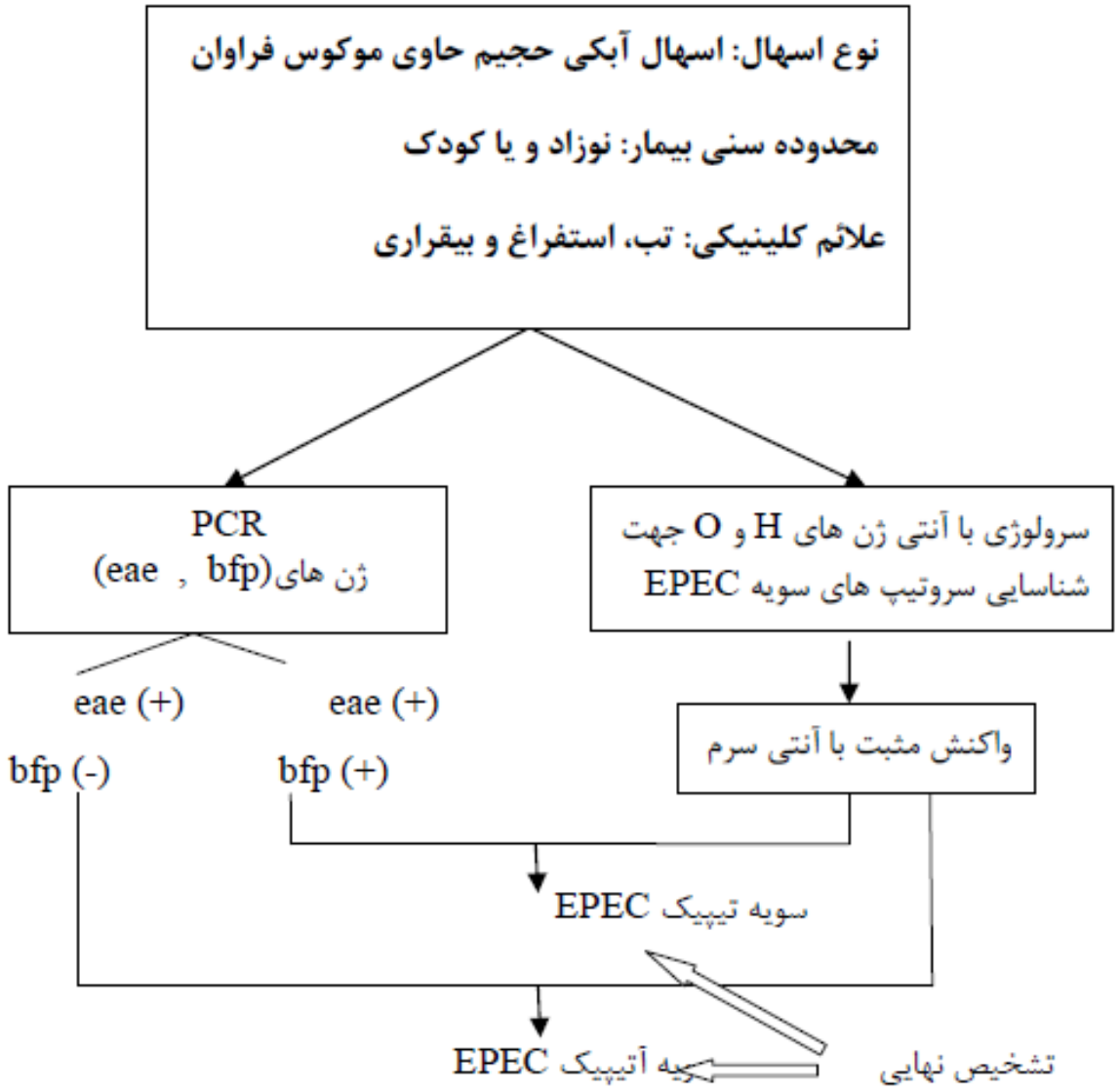
۴-۲) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروپاتوژنیک:

در صورتی که بیمار نوزاد یا کودک بوده و اسهال غیر خونی همراه با تب و استفراغ داشته باشد، نمونه با روش های استاندارد میکروبشناسی برای تشخیص قطعی اشریشیاکلی کشت داده می شود و پس از حصول اطمینان، سرولوژی انجام می گیرد. دسته بندی سویه آنتروپاتوژنیک جدا شده به عنوان تیپیک (eae+ و bfp+) یا آتیپیک (eae+ و bfp+) توسط PCR صورت می گیرد.

تشخیص اولیه


نوع اسهال: اسهال آبکی حجیم حاوی موکوس فراوان
محدوده سنی بیمار: نوزاد و یا کودک
علائم کلینیکی: تب، استفراغ و بیقراری
کشت نمونه مدفوع بر روی محیط مکانکی
رشد کلنی های صورتی رنگ لاکتوز مثبت
برداشت کلنی
کشت بر روی محیط EMB
کشت بر روی محیط TSI
جلای سبز فلزی
A/A , G +/-
کشت بر روی محیط افتراقی
Indol , MR , VP , Cit , Motility
+ + - - +/-

تشخیص نهایی


نوع اسهال: اسهال آبکی حجیم حاوی موکوس فراوان
محدوده سنی بیمار: نوزاد و یا کودک
علائم کلینیکی: تب، استفراغ و بیقراری
PCR
ژن های(eae , bfp)
سرولوژی با آنتی ژن های H و O جهت
شناسایی سروتیپ های سویه EPEC
eae (+)
bfp (-)
eae (+)
bfp (+)
واکنش مثبت با آنتی سرم
سویه تیپیک EPEC
سویه آتیپیک EPEC
تشخیص نهایی

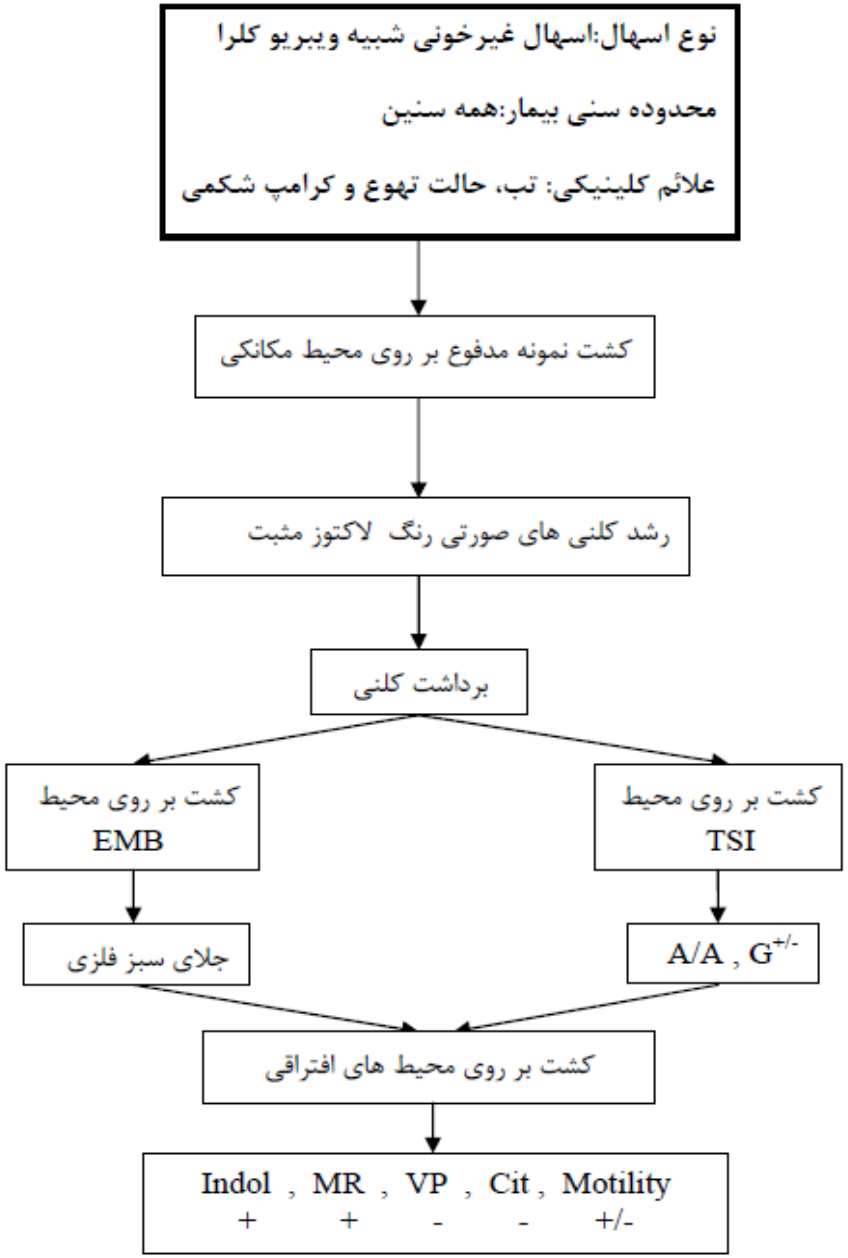
راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

۵-۲) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک:

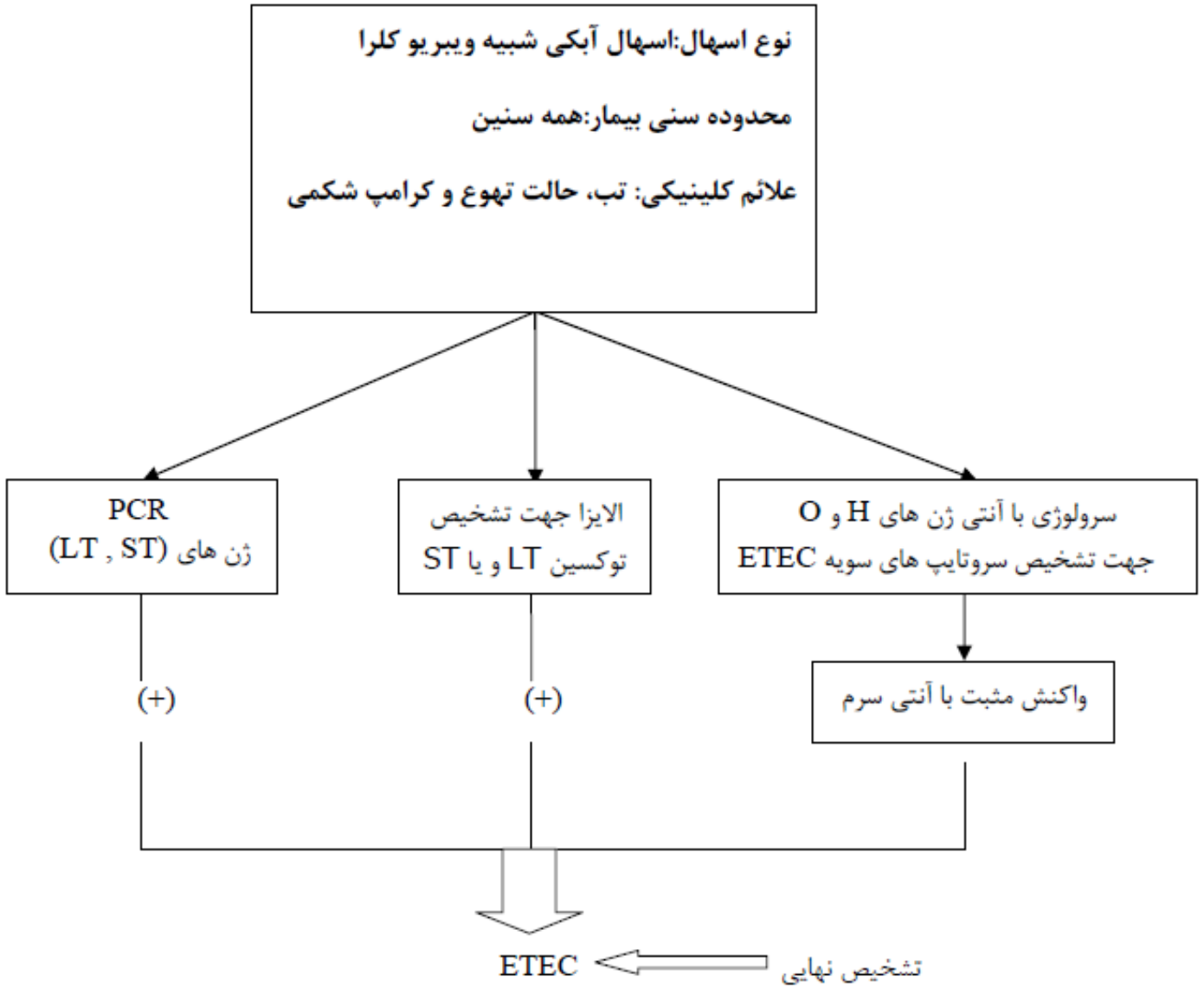
اگر بیماری (بدون توجه به سن) با اسهال غیر خونی (مشابه ویبریوکلرا) که در اثر خوردن غذا وآب آلوده ایجاد شده، به مرکز بهداشتی مراجعه کند ما را مشکوک به سویه ETEC می کند. این بیماری معمولا" با علائم بالینی تهوع و استفراغ و شکم درد و تب همراه می باشد.

اساس تشخیص ETEC بر مبنای شناسایی دو انتروتوکسین LT و ST می باشد که به کمک الایزا و PCR صورت می گیرد و این آزمایشات پس از تعیین هویت باکتری با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی انجام می گیرد. سروتیپ این سویه ها به کمک سرولوژی با آنتی سرم های تجاری تعیین می شود.

تشخیص اولیه


نوع اسهال:اسهال غیرخونی شبیه ویبریو کلرا
محدوده سنی بیمار:همه سنین
علائم کلینیکی: تب، حالت تهوع و کرامپ شکمی
کشت نمونه مدفوع بر روی محیط مکانکی
رشد کلنی های صورتی رنگ لاکتوز مثبت
برداشت کلنی
کشت بر روی محیط EMB
کشت بر روی محیط TSI
جلای سبز فلزی
A/A , G+/-
کشت بر روی محیط های افتراقی
Indol , MR , VP , Cit , Motility
+ + - - +/-

تشخیص نهایی


نوع اسهال:اسهال آبکی شبیه ویبریو کلرا
محدوده سنی بیمار:همه سنین
علائم کلینیکی: تب، حالت تهوع و کرامپ شکمی
PCR
ژن های (LT , ST)
الایزا جهت تشخیص
توکسین LT و یا ST
سرولوژی با آنتی ژن های H و O
جهت تشخیص سروتایپ های سویه ETEC
(+)
(+)
واکنش مثبت با آنتی سرم
ETEC
تشخیص نهایی

راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

6-۲) مراحل تشخیص اشریشیا کلی انتروهموراژیک :

این سویه درکودکان و بزرگسالان مبتلا به این سویه اسهال خونی و یا غیرخونی همراه با علائم بالینی شکم درد ایجاد می نماید. بیماران اغلب در اثر خوردن آب و مواد غذایی و سبزیجات آلوده به این سویه مبتلا می گردند . سویه های گروه انتروهموراژیک اشریشیاکلی شامل سویه O157:H7 و سویه های Non- O157:H7 می باشد. سویه ی O157:H7 قادر به تخمیر سوربیتول نمی باشد ولی گروهی از Non- O157:H7 ها قادرند که سوربیتول را تخمیر کرده و کلنی های صورتی رنگ روی محیط SMAC ایجاد کنند. ضمنا" سویه O157:H7 به سفکسیم و تلوریت مقاوم بوده و رامنوز را تخمیر نمی کند و روی محیط CT-SMAC کلنی های بی رنگ ایجاد می نماید. (البته مشخصات ذکر شده فقط در مورد سویه O157:H7 استاندارد مشاهده شده و در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی سویه بومی O157:H7 با مشخصات ذکر شده جداسازی نشده است.)به همین دلیل محیط کشت SMAC و CT-SMAC محیط کشت کلیدی و اختصاصی در تشخیص سویه های EHEC می باشد .

مراحل کار جهت جداسازی سویه ی O157:H7 و Non- O157:H7 :

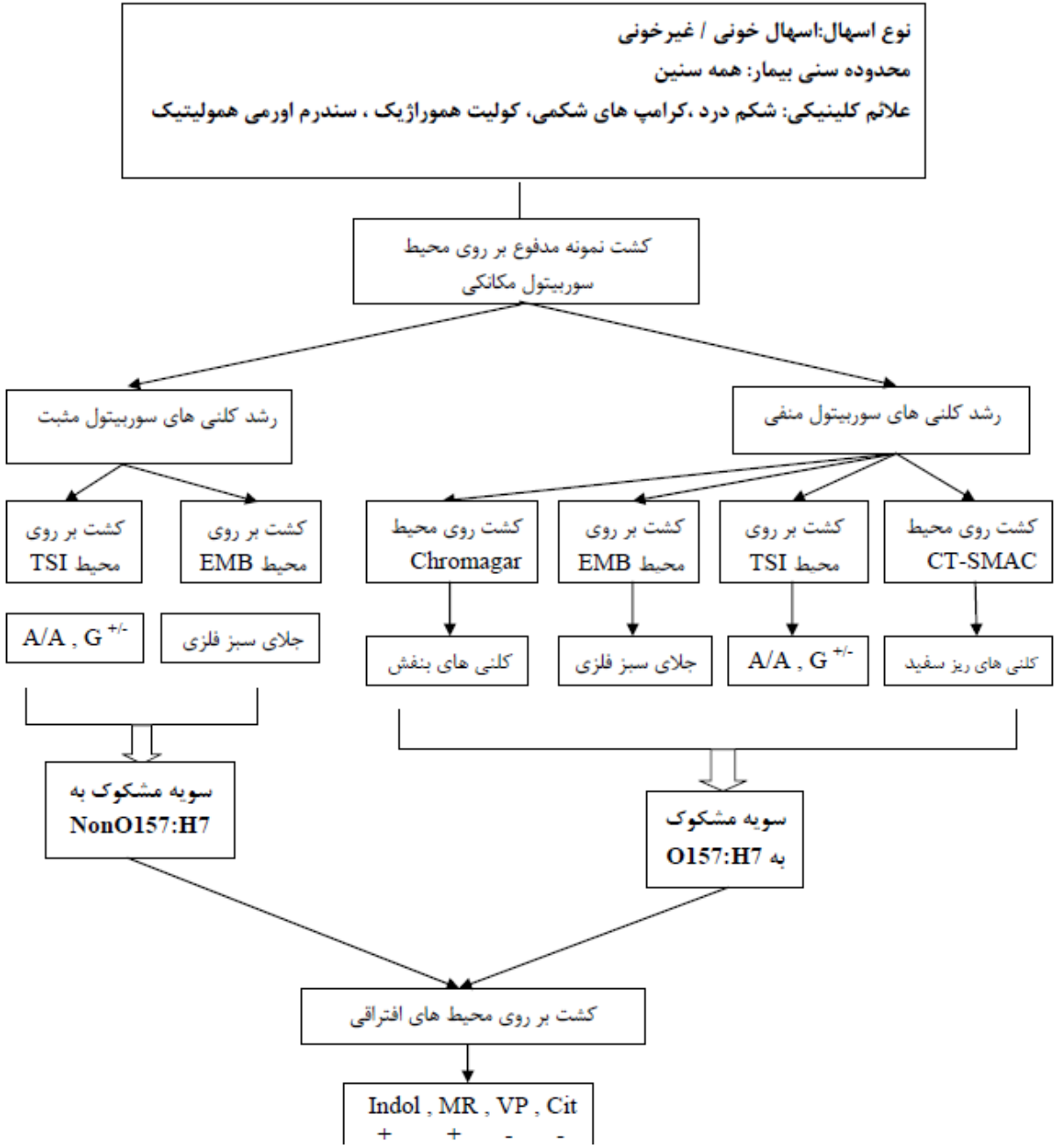
ابتدا پس از بررسی محیط های کشت اولیه ۵ کلنی سوربیتول مثبت و ۵ کلنی سوربیتول منفی از محیط کشت SMAC انتخاب می گردد و با استفاده از روش های استاندارد میکروب شناسی هویت آنها تعیین می گردد . پس از تشخیص اشریشیاکلی، سویه ها با آنتی سرم O157:H7 سرولوژی شده و برای تشخیص نهایی، آزمایش PCR بر روی DNA جدا شده از سویه های EHEC برای سه ژن eae (ژن پروتئین غشایی) ، Stx (ژن شیگاتوکسین) و hlyA (ژن همولیزین) انجام می گیرد. نتایج به ۳ صورت می تواند باشد:

- سویه غیرتخمیری بوده و با انتی سرم O157:H7 واکنش مثبت دهد PCR آن به صورت eae(+) ، Stx(+) و hly(+) باشد که در این صورت سویه مورد نظر E.coli O157:H7 است.

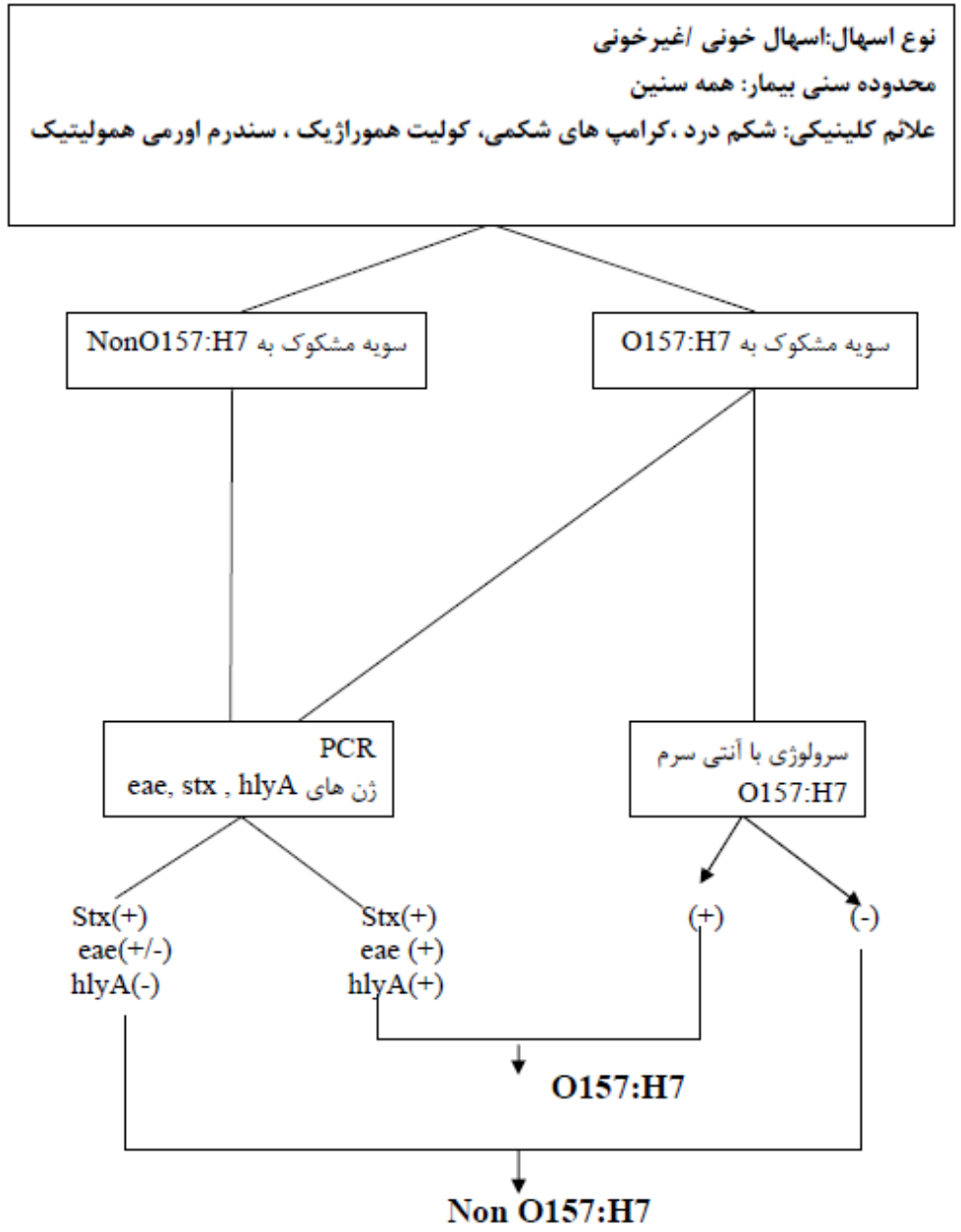
-سویه غیرتخمیری بوده و با آنتی سرم O157:H7 جواب منفی دهد و PCR آن به صورت eae(+) ، Stx(+) و hly(-) باشد که در این موارد سویه E.coli NonO157:H7 است.

-سویه تخمیری بوده و با آنتی سرم O157:H7 جواب منفی دهد و PCR آن به صورت eae(-) ، Stx(+) و hly(-) باشد که در این موارد سویه E.coli NonO157:H7 است.

تشخیص اولیه


نوع اسهال:اسهال خونی / غیرخونی
محدوده سنی بیمار: همه سنین
علائم کلینیکی: شکم درد ،کرامپ های شکمی، کولیت هموراژیک ، سندرم اورمی همولیتیک
کشت نمونه مدفوع بر روی محیط سوربیتول مکانکی
رشد کلنی های سوربیتول مثبت
رشد کلنی های سوربیتول منفی
کشت بر روی محیط TSI
کشت بر روی محیط EMB
کشت روی محیط Chromagar
کشت بر روی محیط EMB
کشت بر روی محیط TSI
کشت روی محیط CT-SMAC
A/A , G +/-
جلای سبز فلزی
کلنی های بنفش
جلای سبز فلزی
A/A , G +/-
کلنی های ریز سفید
سویه مشکوک به NonO157:H7
سویه مشکوک به O157:H7
کشت بر روی محیط های افتراقی
Indol , MR , VP , Cit
+ + - -

تشخیص نهایی


نوع اسهال:اسهال خونی /غیرخونی
محدوده سنی بیمار: همه سنین
علائم کلینیکی: شکم درد ،کرامپ های شکمی، کولیت هموراژیک ، سندرم اورمی همولیتیک
سویه مشکوک به NonO157:H7
سویه مشکوک به O157:H7
PCR
ژن های eae, stx , hlyA
سرولوژی با آنتی سرم
O157:H7
Stx(+)
eae(+/-)
hlyA(-)
Stx(+)
eae (+)
hlyA(+)
(+)
(-)
O157:H7
Non O157:H7

راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

۷-۲) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروانیویسیو:

سویه های EIEC منجر به ایجاد اسهال خونی شبیه دیسانتری همراه با علائم بالینی تب ، کولیت و شکم درد می شوند. این سویه از طریق آب و غذای آلوده به انسان منتقل می گردد.

محیط کشت کلیدی و اختصاصی این سویه Congo red است. سویه های EIEC می توانند کنگورد را از محیط جذب کرده و به صورت کلنی های آجری پررنگ بر روی محیط ظاهر شوند. در حالیکه اشریشیاکلی های غیر پاتوژن یا غیر از سویه های EIEC این قابلیت را ندارند. این سویه ها لاکتوز منفی و غیر متحرک بوده و کلنی های بی رنگ روی محیط مکانکی ایجادکرده و از این حیث شبیه به سویه های شیگلا می باشند.

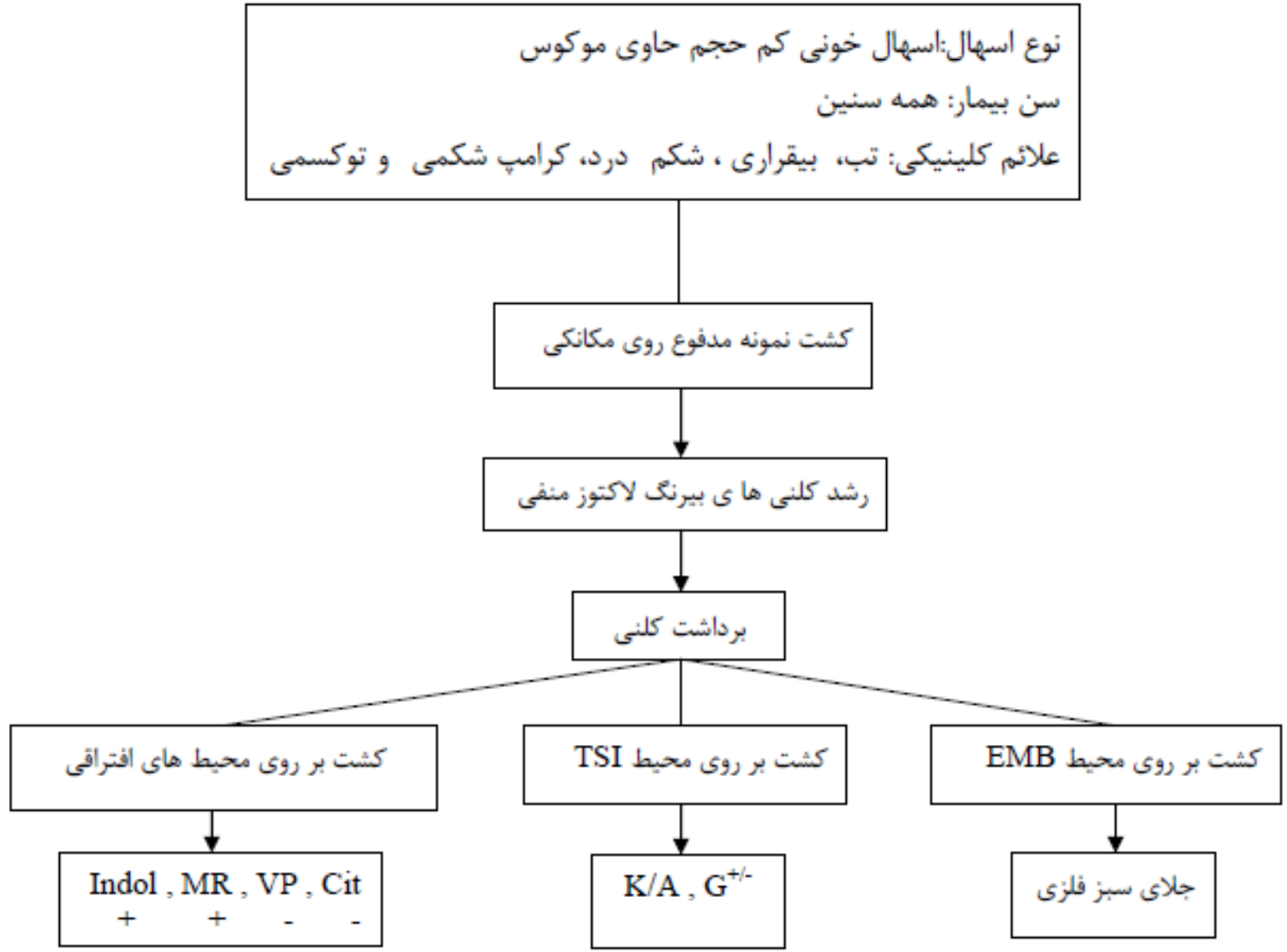
مراحل کار جهت جداسازی سویه های اشریشیاکلی انتروایتویسیو:

پس از انجام تست های افتراقی بر روی ۵ کلنی لاکتوز منفی که از محیط مک کانکی انتخاب شده اند و حصول اطمینان از اینکه سویهٔ جدا شده اشریشیاکلی می باشد، سویه ها را روی محیط کنگورد کشت داده و توانایی جذب این ماده توسط این سویه بررسی می گردد.

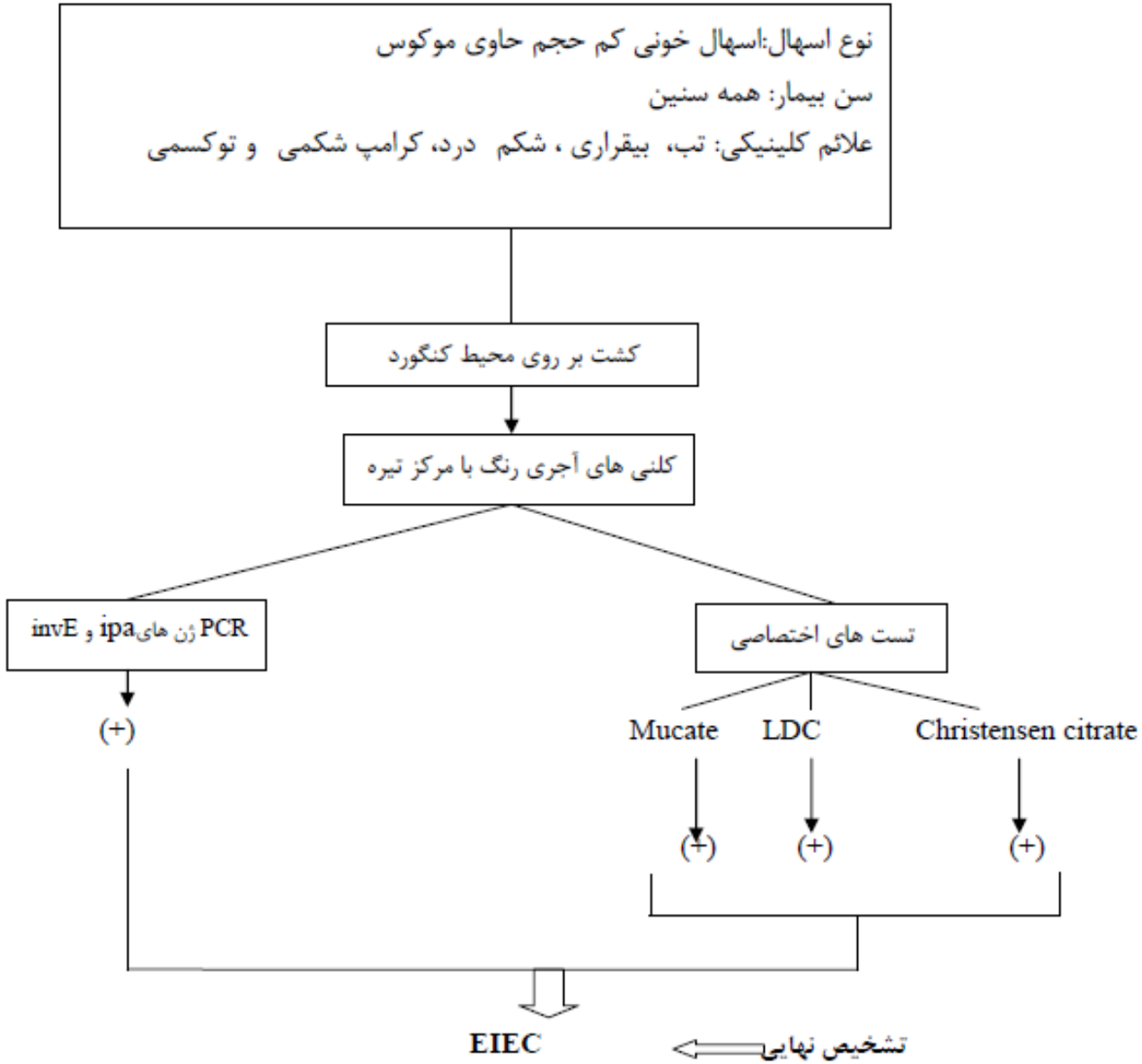
آزمایشات تکمیلی برای اشریشیاکلی های جدا شده از این موارد، استفاده از محیط های افتراقی Christensen citrate ، Mucate و Lysine decarboxylase می باشد.

تشخیص نهایی با انجام PCR برای ژن های ipa و invE صورت می گیرد.

تشخیص اولیه


نوع اسهال:اسهال خونی کم حجم حاوی موکوس
سن بیمار: همه سنین
علائم کلینیکی: تب، بیقراری ، شکم درد، کرامپ شکمی و توکسمی
کشت نمونه مدفوع روی مکانکی
رشد کلنی ها ی بیرنگ لاکتوز منفی
برداشت کلنی
کشت بر روی محیط های افتراقی
کشت بر روی محیط TSI
کشت بر روی محیط EMB
Indol , MR , VP , Cit
+ + - -
K/A , G+/-
جلای سبز فلزی

تشخیص نهایی


نوع اسهال:اسهال خونی کم حجم حاوی موکوس
سن بیمار: همه سنین
علائم کلینیکی: تب، بیقراری ، شکم درد، کرامپ شکمی و توکسمی
کشت بر روی محیط کنگورد
کلنی های آجری رنگ با مرکز تیره
PCR ژن های ipa و invE
تست های اختصاصی
(+)
Mucate
LDC
Christensen citrate
(+)
(+)
(+)
EIEC
تشخیص نهایی

راه‌های تشخیص و شناسایی سویه‌های اشریشیا کلای

۸-۲) مراحل تشخیص اشریشیاکلی انتروآگریگیتیو:

سویه های انتروآگریگیتیو باعث ایجاد اسهال خونی و غیرخونی حاد و مزمن می شوند. این سویه عامل ایجاد اسهال در مسافران نیز می باشد و انتقال آن از طریق آب و غذای آلوده صورت می گیرد.

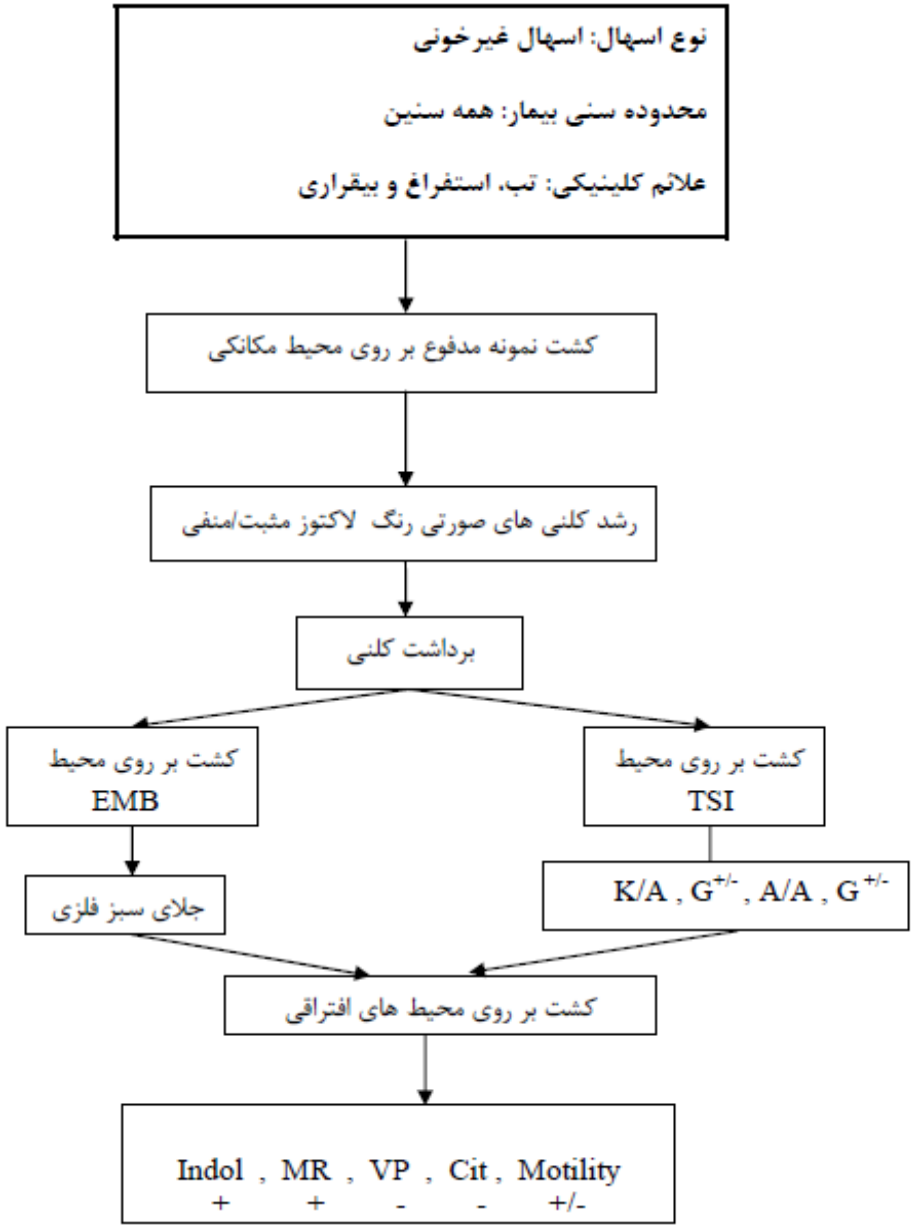
در حال حاضر در اکثر نقاط دنیا تشخیص سویه های EAEC محدود به آزمایشگاه تحقیقاتی می باشد.

در آزمایشگاه مرجع کشوری اشریشیاکلی از دو روش تشخیصی PCR و کشت سلولی جهت شناسایی این سویه استفاده می گردد.

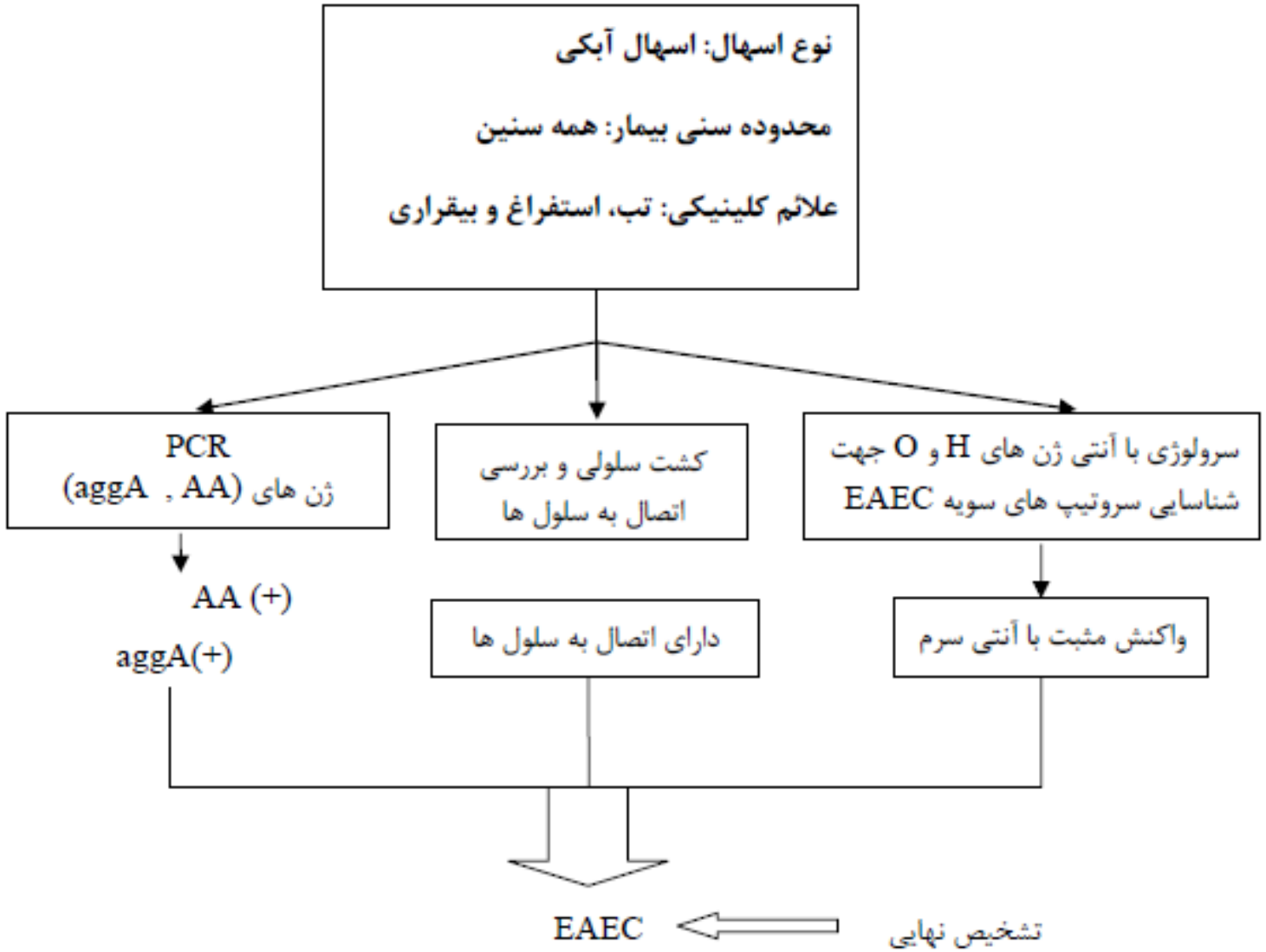
در روش PCR حضور ژن های AA و aggA بررسی شده و در روش کشت سلولی اتصال این سویه به سلول های اپی تلیال HEP-2 مطالعه می گردد که این نتایج منجر به تشخیص و شناسایی این سویه می شود .

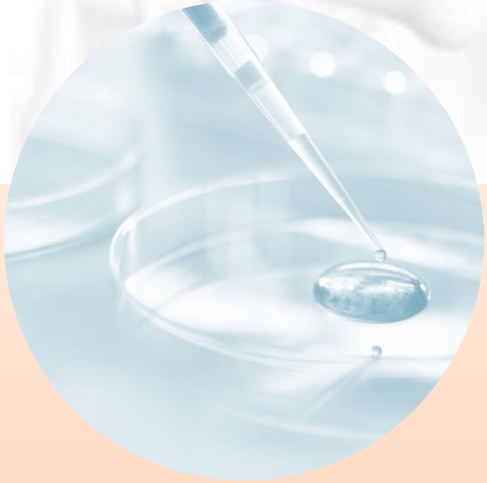
سروتایپ این سویه ها به کمک سرولوژی تعیین می شود.

تشخیص اولیه


نوع اسهال: اسهال غیرخونی
محدوده سنی بیمار: همه سنین
علائم کلینیکی: تب، استفراغ و بیقراری
کشت نمونه مدفوع بر روی محیط مکانکی
رشد کلنی های صورتی رنگ لاکتوز مثبت/منفی
برداشت کلنی
کشت بر روی محیط EMB
کشت بر روی محیط TSI
جلای سبز فلزی
K/A , G+/- , A/A , G +/-
کشت بر روی محیط های افتراقی
Indol , MR , VP , Cit , Motility
+ + - - +/-

تشخیص نهایی


نوع اسهال: اسهال آبکی
محدوده سنی بیمار: همه سنین
علائم کلینیکی: تب، استفراغ و بیقراری
PCR
ژن های (aggA ، AA)
کشت سلولی و بررسی
اتصال به سلول ها
سرولوژی با آنتی ژن های H و O جهت
شناسایی سروتیپ های سویه EAEC
AA (+)
aggA(+)
دارای اتصال به سلول ها
واکنش مثبت با آنتی سرم
EAEC
تشخیص نهایی



با تشکر از توجه شما