

با نام و یاد خدا

نمونه گیری مدفوع برای کشت در جداسازی و تشخیص عوامل بیماریزای شایع در بیماری های منتقله از آب و غذا

رقیه صبوریان

آزمایشگاه مرجع سلامت

تیر ماه ۱۴۰۱

مدیریت نمونه و اهمیت آن

- تشخیص صحیح عامل بیماری زا در گاستروانتریت به عواملی مانند عوامل زیر وابسته است:
  - تهیه نمونه مناسب و با کیفیت
  - نمونه گیری به روش صحیح
  - حجم کافی نمونه
  - نگهداری و انتقال نمونه در شرایط مناسب قبل از آزمایش

- برای اطمینان از نمونه گیری صحیح به دستورالعمل های ساده و کاربردی نیاز است:
  - شامل روش جمع آوری صحیح نمونه، شرایط نگهداری و انتقال آن
  - بصورت کاغذی یا الکترونیک در دسترس باشد.
  - کارکنان از دستورالعمل آگاهی داشته و به درستی اجرا کنند یا بتوانند با مراجعه به آن سریعا اطلاعات لازم را پیدا کنند.
  - به طور منظم به روز شده باشد.

نمونه گیری مدفوع چه زمانی باید انجام شود

- بهترین زمان نمونه گیری:
  - طی مرحله حاد بیماری
  - هر چه سریع تر بعد از شروع بیماری (ترجیحا در طی ۴ روز اول بعد از بروز اولین علائم بیماری)
    - یعنی زمانی که عوامل بیماری زا معمولا به بیشترین تعداد در مدفوع وجود دارند، زیرا این عوامل با گذشت زمان کاهش پیدا می کنند.
  - قبل از شروع درمان با آنتی بیوتیک

روش های نمونه گیری مدفوع

- نمونه مدفوع تازه
- نمونه سواب مدفوع
- نمونه رکتال سوآب

- اصولاً نمونه مدفوع تازه نسبت به سوآب (سواب مدفوع یا سواب مقعدی) برتري دارد.
  - چرا که امکان بررسی همزمان عوامل بیماری زای باکتریایی، انگلی و ویروسی را برای آزمایشگاه امکان پذیر می نماید.
- البته در برخي شرايط سوآب كاربرد بيشتري دارد. بطور مثال
  - زمانی که سریعاً به نمونه مدفوع نیاز باشد.
  - و یا در مواقعی که تعداد نمونه گیری زیاد است، به دلیل تسهیل در نگهداری و انتقال، نمونه سواب ارجحیت دارد.
  - سوآب مقعدي براي باكتريهاي مهاجم به مخاط روده مانند شيگلا انتخاب مي شود. زيرا نمونه با ساييدن سوآب به مخاط روده جمع آوري مي گردد.
  - همچنین برای نمونه گیری از نوزادان و کودکان سواب مقعدی نمونه مناسبی است. در این روش، انجام صحیح نمونه گیری بسیار مهم است.

نمونه مدفوع تازه برای تشخیص ویروس های روده ای

- زمانی که گاستروانتریت ویروسی مطرح است:
  - نمونه ارجح برای آزمایش: نمونه مدفوع تازه شل یا آبکی، جمع آوری شده در اسرع وقت حتما طی ۴۸ ساعت اول شروع علائم بالینی
  - مدفوع آبکی (liquid) یا شل (soft): حداقل ۱۰ میلی لیتر
  - از ۱۰ فرد بیمار
  - در ظرف پلاستیکی یکبار مصرف تمیز (نیاز به استریل بودن نیست)، خشک، دهان گشاد با اندازه مناسب، با در پوش محکم و فاقد نشتی
  - بدون آلودگی با ادرار، فاقد مواد نگهدارنده، شوینده، یونهای فلزی و باریوم یا کاغذ توالت
  - ظروف نمونه گیری باید دارای برچسب حداقل شامل: شماره نمونه، نام کامل بیمار و تاریخ نمونه گیری
  - در موارد طغیان در صورت امکان برای تایید اپیدمیولوژیک حداقل از ده نفر بیمار نمونه مدفوع تازه اسهالی از هر فرد حداقل ۱۰ میلی لیتر.
  - نمونه ها باید به سرعت به ۴ درجه سانتیگراد منتقل شود و در صورت کوتاه بودن فاصله با همین شرایط دمایی (در cold box با ایمنی مناسب با یخ فراوان یا آیس پک) به آزمایشگاه منتقل شود. در صورت طولانی بودن زمان انتقال نمونه ها (حداکثر ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از نمونه گیری) در دمای منفی ۲۰ درجه فریز و با یخ خشک به آزمایشگاه انتقال یابند.

نمونه مدفوع تازه برای تشخیص باکتری های بیماریزای روده ای

- زمانی که گاستروانتریت باکتریایی مطرح است:
  - نمونه ارجح برای کشت: نمونه مدفوع تازه، جمع آوری شده در فاز حاد بیماری
  - آبکی (liquid) یا شل (soft): حدود ۵ میلی لیتر
  - سفت (formed): ۰/۵ تا ۲ گرم نمونه
  - از ۱۰ فرد بیمار
  - در ظرف پلاستیکی یکبار مصرف تمیز (نیاز به استریل بودن نیست)، خشک، دهان گشاد با اندازه مناسب، با در پوش محکم و فاقد نشتی
  - بدون آلودگی با ادرار، فاقد مواد نگهدارنده، شوینده، یونهای فلزی و باریوم یا کاغذ توالت
    - کاغذ توالت ممکن است به املاح باریوم آغشته باشد که باعث مهار رشد میکروارگانیسم های انتروپاتوژن می شود.
  - ظروف نمونه گیری باید دارای برچسب حداقل شامل: شماره نمونه، نام کامل بیمار و تاریخ نمونه گیری
  - نمونه های مدفوع تازه باید هر چه سریع تر تا ۳۰ دقیقه بعد از نمونه گیری و حداکثر در مدت ۲ ساعت بعد از نمونه گیری به آزمایشگاه تحویل داده شود و مورد آزمایش قرار گیرد.
    - این موضوع برای جداسازی شیگلا و کمپیلوباکتر بسیار حائز اهمیت است.

نمونه سوآب مدفوع

- اگر نمونه در مدت ۲ ساعت بعد از نمونه گیری نمی تواند مورد آزمایش قرار گیرد:
  - باید از نمونه مدفوع تازه، سواب مدفوع تهیه و سواب در محیط انتقال کری بلر وارد نموده و بلافاصله در یخچال گذاشته شود.
    - قرار دادن نمونه موجود در کری بلر در یخچال ۴ درجه سانتیگراد قبل از انجام آزمایش باعث نگهداری بهتر باکتری های بیماری زای روده ای می شود، به استثناء شیگلا.
- تهیه سوآب مدفوع:
  - یک سوآب استریل را درون نمونه مدفوع قرار داده و پس از حرکت چرخشی، مقدار کمی از آن را بردارید.
  - در صورت مشاهده موکوس یا خون در مدفوع باید با سوآب از آنها نیز نمونه گرفت.
  - سوآب را تا عمق لوله محیط انتقال مناسب (Cary-Blair) که قبلا به مدت ۱ تا ۲ ساعت در یخچال خنک شده است، وارد کنید.
  - قسمت بالایی چوب را که با انگشتانتان لمس می کنید، بشکنید و دور بیندازید.
  - درب 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.

نمونه رکتال سوآب

- معایب:
  - حساسیت کمتر نسبت به نمونه مدفوع تازه جهت کشت
- مزایا:
  - نمونه مناسبی است برای نمونه گیری از نوزادان و کودکان یا وقتی که جداسازی شیگلا مطرح باشد.
  - روش نمونه گیری با سواب (رکتال سواب یا سواب مدفوع تازه) در مواقعی که حجم نمونه گیری زیاد است، به دلیل تسهیل در نگهداری و انتقال ارجحیت دارد.

نمونه رکتال سوآب

- روش نمونه گیری رکتال سوآب:
  - ابتدا سوآب استریل را با قرار دادن در محیط انتقال (کری بلر) مرطوب نمایید.
  - از سوآب پنبه ای سالم استفاده کنید و دقت نمایید که پنبه سر آن کنده نشده باشد. از ژل جهت چرب کردن مقعد استفاده نشود.
  - سر سوآب را حدود ۲ تا ۳ سانتیمتر در رکتوم فرو برده، با احتیاط بچرخانید تا با مخاط انتهایی رکتوم تماس یابد و سپس خارج کنید.
  - با مشاهده سوآب از وجود مدفوع روی پنبه سوآب مطمئن شوید.
  - سوآب را در عمق محیط انتقال مناسب (Cary-Blair) که قبلا به مدت ۱ تا ۲ ساعت در یخچال خنک شده است، فرو برید، به گونه ای که سر پنبه ای سوآب داخل محیط قرار گیرد. قسمتی از چوب سوآب را که با انگشت تماس داشت را شکسته و دور بیندازید. لوله را بلافاصله در یخچال قرار دهید.

توجه

- در تمامی موارد فوق حداقل ۲ سوآب مدفوع یا مقعدی باید برای هر بیمار جمع آوری و هر دو سوآب را در یک لوله حاوی محیط انتقال قرار داد. ولی تعداد سوآب مورد نیاز بسته به تعداد عوامل پاتوژن مورد مطالعه می تواند تغییر کند.

نگهداری نمونه بعد از نمونه گیری

- نمونه های مدفوع تازه باید هر چه سریع تر تا ۳۰ دقیقه بعد از نمونه گیری و حداکثر در مدت ۲ ساعت بعد به آزمایشگاه تحویل داده شود و مورد آزمایش قرار گیرد.
- اگر نمونه در مدت ۲ ساعت نمی تواند مورد آزمایش قرار گیرد، باید از نمونه مدفوع تازه، سواب مدفوع تهیه نموده و سواب در محیط انتقال کری بلر در یخچال یا Cold Box قرار داد.
- نمونه سواب مدفوع یا رکتال سواب در محیط انتقال در یخچال یا ارسال آنها با رعایت شرایط زنجیره سرد باید در مدت ۲۴ ساعت و حداکثر ۷۲ ساعت به آزمایشگاه تحویل داده شود.
- اما اگر نمونه بیش از ۷۲ ساعت باید نگهداری شود، باید هر چه سریع تر پس از نمونه گیری در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتیگراد منجمد شود. نگهداری در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتیگراد برای مدت کوتاه قابل قبول است. ولي مي بايستي هر چه سريعتر در خصوص انتقال نمونه به آزمایشگاه اقدام نمود.
  - غیر از مواردی که جداسازی کمپیلوباکتر ژژونی و عوامل انگلی از مدفوع مطرح می باشد، که نمونه نباید منجمد شود.

نگهداری نمونه بعد از نمونه گیری

TABLE 31: Collection and transport of fecal specimens for laboratory diagnosis

Fecal Specimens for the Laboratory	When to collect	When the patient is having diarrhea, as soon after onset of illness as possible (preferably within 4 days of onset) and before antimicrobial treatment is started.
	How much to collect	Rectal swab or swab of fresh stool in transport medium.
	Transport medium	Cary-Blair or other suitable transport medium (NOT buffered glycerol saline for *V. cholerae*).
	Storage after collection	Refrigerate at 4°C if the specimens will be received by the laboratory within 48 hours or freeze at -70°C. Fecal specimens from patients with suspected cholera can be transported at ambient temperature and held for longer times if necessary; however, refrigeration is preferred.
	Transportation	Seal tubes/containers to prevent leakage; place in waterproof container to protect from wet or dry ice. Ship in insulated box with ice packs, wet ice, or dry ice by overnight delivery.

محیط انتقال (Transport Medium)

- محیط های انتقال بسته به مورد استفاده، طراحی شده است برای اینکه:
  - ارگانیسم را برای یک دوره زمانی معین زنده نگه دارد و
  - رشد زیاد آن را با استفاده از آنتی بیوتیک های مختلف یا با کاهش اکسیژن محیط مهار کند.
- محیط انتقال مورد استفاده برای نمونه های مدفوعی شامل
  - Stuart's
  - Amies
  - Cary-Blair
- محیط Cary-Blair نسبت به دو محیط انتقال Amies و Stuarts برای نگهداری و انتقال ویبریو کلرا برتری دارد.
  - به دلیل pH بالای محیط (۸/۴)
- همچنین برای انتقال بسیاری از عوامل بیماریزای روده از جمله شیگلا و اشریشیا کلی O157:H7 کاربرد دارد.
- قوام نیمه جامد کری بلر موجب آسانی حمل و نقل می شود.

محیط انتقال (Transport Medium)

- نحوه تهیه:
  - مطابق دستور سازنده
  - توصیه می شود از محیط کشت کری بلر اصلاح شده که در آن مقدار آگار ۱.۶ گرم در لیتر (به جای ۵ گرم) می باشد، استفاده شود.
  - توزیع در ظروف یا لوله های پلاستیکی شفاف (در صورت عدم دسترسی، در ظروف یا لوله های شیشه ای) درپوش دار محکم
  - حجم محیط کری بلر داخل ظرف یا لوله به اندازه ای که دارای حداقل ۴ سانتیمتر عمق باشد.
  - با درپوش شل ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش یا مطابق دستور سازنده استریل شود.
- نحوه نگهداری:
  - درب لوله ها را پس از استریل کردن و خنک شدن محکم ببندید.
  - کری بلر باید در لو له های شفاف با درب محکم و در مکانی خنک و دور از نور نگهداری گردد.
  - در صورت کاهش نیافتن حجم محیط و عدم تغییر رنگ و آلودگی تا ۶ ماه قابل استفاده است.

کنترل کیفیت محیط Cary-Blair

۱) برای انجام کنترل کیفیت هر سری ساخت محیط کری بلر از هر یک از باکتریهای
   - *V. cholerae* non O1
   - *Sh. flexneri* ATCC 12022
   - *Sal*. Typhimurium ATCC 14028

۲) سوسپانسیون های جداگانه مطابق کدورت نیم مک فارلند تهیه نمایید.

۳) یک سواب استریل را کاملا در هر سوسپانسیون آغشته نموده، آب اضافه سواب را با فشردن آن به دیواره لوله خارج نمایید و آنرا داخل محیط کری بلر فرو ببرید.

۴) محیط کری بلر حاوی سواب را به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق نگهداری نمایید.

۵) سپس از این سواب روی پلیت مناسب مانند بلاد آگار حاوی خون گوسفند کشت دهید، که باید رشد قابل قبولی مشاهده شود.

برچسب گذاری نمونه ها

- شماره نمونه، نام بیمار و تاریخ نمونه گیری باید به شکلی خوانا بر روی برچسب ضد آب روی لوله نمونه نوشته شود.
- اطلاعات بیمار باید بر روی داده برگ ثبت شود، یک نسخه با نمونه ها ارسال و دیگری توسط فرستنده نگهداری شود.
- اطلاعات لازم شامل:
  - نام کامل بیمار
  - تاریخ نمونه گیری
  - تاریخ بروز اولین علائم
  - ذکر وجود خون در نمونه
  - اطلاعات تماس با بیمار
  - مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها قبل از جمع‌آوری نمونه
  - اطلاعات کلینیکی مفید و تاریخچه بیمار (مانند سابقه مسافرت یا مصرف مواد غذایی) برای تفسیر نتایج میکروبیولوژی ضروریست.

خطاهای رایج در نمونه گیری

- خطاهای دفتری:
  - تفاوت بین مشخصات بیمار روی برگه درخواست و برچسب ظرف نمونه
  - عدم ثبت مشخصات بیمار روی ظرف نمونه
  - عدم ثبت منبع نمونه یا نوع نمونه
  - عدم ثبت نوع آزمایش در درخواست
- خطاهای عمومی:
  - ظرف نمونه نامناسب
  - نشت کردن نمونه از ظرف
  - سوآب خشک
  - استفاده از محیط انتقال تاریخ مصرف گذشته (خشک یا حاوی قارچ)
  - ارسال بیش از یک نمونه یک بیمار در یک روز از همان منبع
  - ارسال یک سوآب با چند درخواست برای ارگانیسم های متفاوت (باکتری، ویروس و ...)
  - تحویل دیر هنگام نمونه به آزمایشگاه (بیش از ۷۲ ساعت)

دستورالعمل معیارهای رد نمونه

- وجود دستورالعمل معیارهای رد نمونه برای کشت مدفوع بر اساس مراجع معتبر در بخش های پذیرش و باکتری شناسی، آگاهی کارکنان از آن، و اجرای آن
- وجود سوابق رد نمونه یا سوابق اعلام نمونه های نامناسب به واحد بیماری ها
- در مواردی که نیاز به نمونه گیری مجدد باشد، به صورت مناسب به پزشک مسئول، واحد مبارزه با بیماری ها و/ یا بیمار اطلاع داده شود.
- این فرآیند در دستورالعمل نوشته شود.
- سوابق اطلاع رسانی در صورت نیاز به نمونه گیری مجدد در آزمایشگاه موجود باشد.

معیار های رد نمونه

- نمونه مدفوع که بیشتر از دو ساعت بعد از نمونه گیری بدون محیط انتقال به آزمایشگاه تحویل داده شده است. زیرا برای جداسازی اکثر شیگلاها نامناسب است. اگر نمونه گیری مجدد امکان پذیر نمی باشد و پزشک درخواست داده است، کشت را انجام داده و کامنت بگذارید: تاخیر دریافت نمونه توسط آزمایشگاه ممکن است جداسازی پاتوژن ها را با مشکل مواجه سازد.
- اگر نمونه در محیط انتقال بیشتر از ۷۲ ساعت بعد از نمونه گیری در ۴ درجه سانتیگراذ یا بیشتر از ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه تحویل داده شده است. اگر نمونه گیری مجدد امکان پذیر نمی باشد، کشت را انجام داده و کامنت بگذارید: به دلیل تاخیر در انتقال نمونه ممکن است نتیجه کشت به طور کاذب منفی باشد.
- کشت مدفوع دریافت شده از بیماران بزرگسال و اطفال بستری در بیمارستان بیشتر از ۳ تا ۴ روز، به استثناء بیماران HIV مثبت یا وقوع اپیدمی. نمونه مدفوع نوزادان و کودکان تا بعد از ۴ روز بستری در بیمارستان را رد نکنید، زیرا ممکن است جمع آوری نمونه مدفوع از آنها بیشتر طول بکشد.
- ارسال یک سوآب با چند درخواست برای ارگانیسم های متفاوت (باکتری، ویروس و ...)
- چند نمونه مدفوع از همان بیمار در یک روز به آزمایشگاه ارسال شده باشد.
- سواب های خشک (عدم وجود نمونه روی پنبه سوآب) نباید آزمایش شوند.
- نمونه های مدفوع آغشته به ادرار و یا باریوم نباید آزمایش شوند.

معیارهای رد نمونه

- نمونه های نگهداری شده در محیط های انتقال حاوی فرمالین یا مواد نگهدارنده (PVA)
- نمونه های سواب که در عمق محیط کری بلر وارد نشده باشند.
- نمونه هایی که محیط انتقال آنها خشک، آبکی یا دارای قارچ باشد.
- نمونه های با لوله شکسته یا درب لوله آنها بسته نباشد.
- نمونه هايي که فاقد برچسب باشند، یا مشخصات روی برچسب ناخوانا باشند.
- نمونه های بیمارانی که تحت درمان آنتی بیوتیکی هستند، مگر با دستور پزشک مبنی بر پیگیری روند درمان.
- محیط انتقال فاقد سوآب نمونه باشد.

ثبت اطلاعات

- فرم (کاغذی یا الکترونیک) پذیرش نمونه حاوی اطلاعات ضروري (مشخصات بیمار، تشخیص احتمالی بیماری، سابقه مصرف آنتی بیوتیک و ...) در آزمایشگاه وجود داشته باشد و تکمیل گردد.
- در مواردی که کشت مدفوع به آزمایشگاه ارجاع شده، آزمایشگاه بعد از دریافت نمونه، باید این موارد را باید به طریق مناسب ثبت و نگهداری نماید:
  - تاریخ نمونه گیری
  - تاریخ دریافت نمونه
  - تاریخ انجام آزمایش
  - تاریخ گزارش نتیجه

جداسازی و تشخیص آزمایشگاهی *ویبریو کلرا*

رقیه صبوریان

آزمایشگاه مرجع سلامت

تیر ماه ۱۴۰۱

فیلوژنی ویبریوناسه

- نام Vibrionaseae در سال ۱۹۶۵ توسط Veron با هدف گروه بندی عضوی از باسیل های گرم منفی غیرروده ای تخمیری که اکسیداز مثبت و بواسطه یک تاژک قطبی متحرک بودند، پیشنهاد شد.
- این گروه بندی به منظور افتراق بین این میکروارگانیسم ها از خانواده انتروباکترال ها انتخاب شده بود و لزوما دال بر ارتباط تاکسونومی در بین گونه های این گروه نبوده است.
- سابقا ویبریوناسه شامل ۴ جنس بود:
  - *Vibrio*، *Aeromonas*، *Photobacterium* و *Plesiomonas*
- اما در چند دهه اخیر بر اساس شواهد ژنتیک مولکولی:
  - *Aeromonas* species در خانواده جداگانه ای به نام Aeromonadaceae و
  - *Plesiomonas* در خانواده Enterobacterales به عنوان عضوی از جنس *Proteus* قرار گرفته اند.

گونه های ویبریو دارای اهمیت بیماری زایی در انسان

- گونه هایی که از انسان جدا می شوند و عامل بیماری هستند، به دو گروه تقسیم می شوند:
  - *Vibrio cholerae* (O1 & Non O1)
  - Noncholera Vibrios

Clinical Infections Associated with *Vibrio* Species

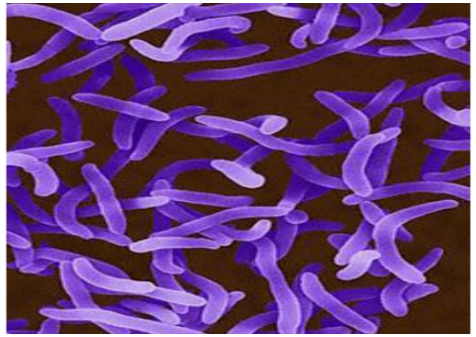
Species	Clinical Infection	Frequency
V. cholerae O1	Cholera, gastroenteritis, wound infections, bacteremia	Common
V. cholerae O139	Cholera	Relatively common
V. cholerae non-O1	Gastroenteritis, septicemia, ear infections	Relatively common
Vibrio parahaemolyticus	Gastroenteritis, wound infections	Common
Vibrio vulnificus	Septicemia, wound infections	Common
Vibrio alginolyticus	Wound infections, ear infections, conjunctivitis, respiratory infections, bacteremia	Common
Vibrio mimicus	Gastroenteritis, ear infections	Uncommon
*Vibrio damsela**	Wound infections	Uncommon
Vibrio fluvialis	Gastroenteritis	Uncommon
Vibrio furnissii	Gastroenteritis	Uncommon
Vibrio cincinnatiensis	Meningitis	Rare
Vibrio metschnikovii	Septicemia, peritonitis	Rare
Vibrio harveyi (Vibrio carchariae)	Wound infections	Rare
Grimontia (Vibrio) hollisae†	Gastroenteritis	Uncommon

Abbott SL et al: *Vibrio* and related organisms. In Murray PR et al, editors: *Manual of clinical microbiology,* ed 9,Washington, DC, 2007, ASM Press.
*Proposed as *Photobacterium damsela.*
†Reclassified as *Grimontia hollisae.*

Vibrio cholerae

- ***Vibrio cholerae***
  - عامل ایجاد اپیدمی و پاندمی بیماری وبا (Cholera)
  - بیماری اسهالی خطرناک است که انسان (بزرگسالان و کودکان) را مبتلا کرده و به عنوان مشکل جدی جهانی برای چند قرن است.
  - سبب اسهال آبکی شدید شده و در صورت عدم درمان سریع، می تواند به سرعت باعث از دست رفتن شدید آب و در نهایت منجر به مرگ شود.
  - ۷ پاندمی وبا در تاریخ رخ داده است، که بیوتایپ التور *Vibrio cholerae* O1 مسئول هفتمین پاندمی (از سال ۱۹۶۱) بوده است.
  - *ویبریو کلرا* انتروتوکسینی به نام Cholerae Toxin (CT) تولید می کند، که مسئول ظهور بیماری وبا می باشد.
  - امروزه وبا عمدتا به کشورهای در حال توسعه محدود می شود، که در آنها شرایط آب آشامیدنی نامناسب بوده و اصول بهداشتی به خوبی رعایت نمی شود.
  - سالانه بین ۴-۱/۳ میلیون نفر در دنیا به این بیماری مبتلا می شوند و ۱۴۳۰۰۰-۲۱۰۰۰ نفر به دلیل ابتلای به این بیماری جان خود را از دست میدهند.

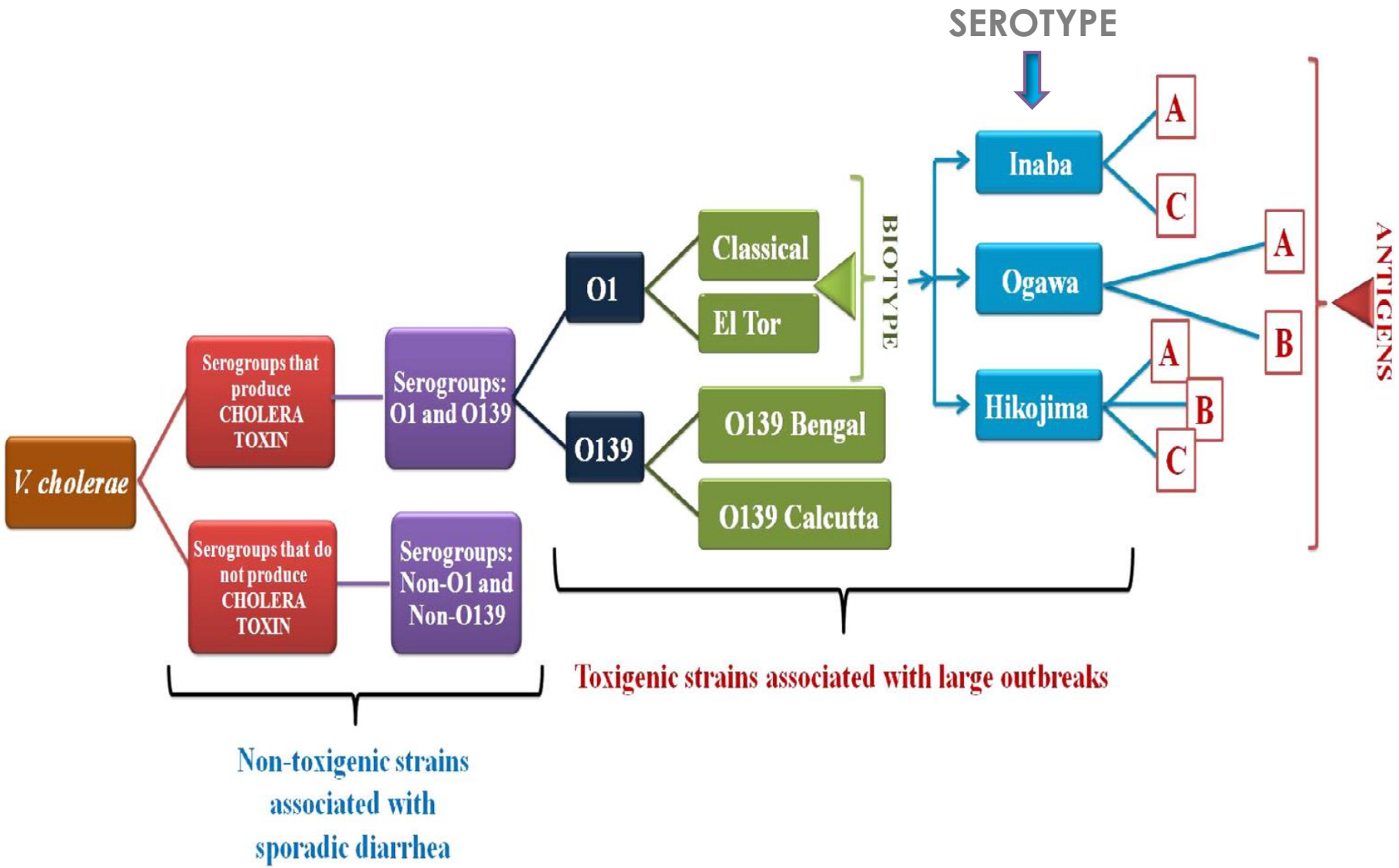
مورفولوژی و خصوصیات ویبریو کلرا



- باسیل گرم منفی بدون اسپور, دارای تاژک قطبی غلافدار
- قطر تقریبی ۰/۵ تا ۰/۸ میکرومتر و طول ۱/۵ تا ۳ میکرومتر
- در رنگ آمیزی گرم اولیه بر روی نمونه بالینی: باکتری میله ای خمیده گرم منفی
- در رنگ آمیزی گرم از کلنی: باسیل های گرم منفی صاف کوچک که می توانند بسیار پلی مورف باشند، مخصوصا زمانی که شرایط کشت مناسب نباشد.
- پیلی های متنوعی دارد که در بیماریزایی باکتری خیلی موثر می باشد.
- دارای متابولیسم هوازی و تخمیری می باشند.
- اکسیداز مثبت بوده و از بسیاری جهات شبیه انتروباکتریاسه هستند. وجه افتراق ویبریوها از انتروباکتریاسه ها اکسیداز مثبت بودن آنها و داشتن تاژک قطبی می باشد.
- وجه تمایز ویبریوها از سودوموناس ها، اکسیداتیو و فرمانتیتیو بودن آنهاست، در صورتی که سودوموناس ها اکسیداتیو می باشند.
- می تواند یک تا دو هفته در آب، چند روز در غذای قلیایی مرطوب در دمای معمولی و طولانی تر در غذای نگهداری شده در یخچال یا فریزر زنده بماند.

سروگروه های ویبریو کلرا

- سروگروه های *ویبریو کلرا* بر اساس آنتی ژن O که قسمتی از لیپوپلی ساکارید دیواره سلولی می باشد، تشخیص داده می شوند.
- تاکنون حداقل ۲۰۶ گروه آنتی ژن O تشخیص داده شده است.
- در بین این سروگروه ها تنها دو سروگروه O1 و O139 به عنوان عامل بیماری وبا شناخته شده اند.
- بنابراین ویبریو کلرا بر اساس آنتی ژن های سوماتیک (آنتی ژنO) در دو سروگروه طبقه بندی می شود:
  - **سروگروه O1:** *ویبریو کلرای* آگلوتینه دهنده با آنتی سرم پلی والان O1
    - کلرا توکسین تولید می کنند و عامل ایجاد اپیدمی هستند.
  - **سروگروه Non O1:** *ویبریو کلرایی* که با آنتی سرم پلی والان O1 آگلوتینه نمی دهد (serogroups O2-O206).
    - معمولا کلرا توکسین تولید نمی کنند و عامل ایجاد اپیدمی نمی باشند (عامل اسهال تک گیر).
    - سروگروه O139 که در سال ۱۹۹۲ در کلکته، بنگلادش و قسمت هایی از هند ظهور پیدا کرد، کلرا توکسین تولید می کند. این سروگروه در سراسر شبه قاره هند و بنگلادش اپیدمی هایی ایجاد کرده است.

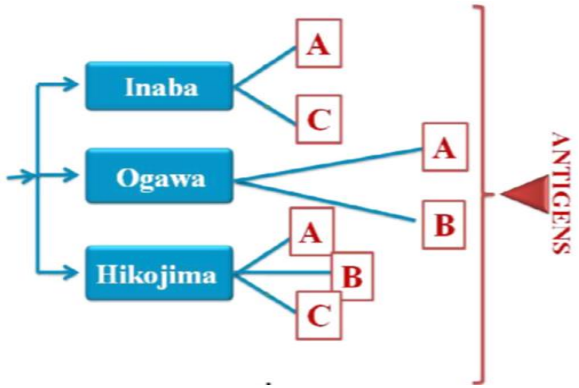

SEROTYPE
V. cholerae
Serogroups that produce CHOLERA TOXIN
Serogroups that do not produce CHOLERA TOXIN
Serogroups: O1 and O139
Serogroups: Non-O1 and Non-O139
O1
O139
Classical
El Tor
O139 Bengal
O139 Calcutta
BIOTYPE
Inaba
Ogawa
Hikojima
A
C
A
B
A
B
C
ANTIGENS
Toxigenic strains associated with large outbreaks
Non-toxigenic strains associated with sporadic diarrhea

بیوتایپ های ویبریو کلرا

- *ویبریو کلرا* سروگروه O1 دارای دو بیوتایپ کلاسیک (Classical) و التور (El Tor) می باشد:
  - **بیوتایپ کلاسیک (Classical)**
  - **بیوتایپ التور (El Tor)**



سروتایپ های ویبریو کلرا



- *ویبریو کلرا* سروگروه O1 همچنین دارای سه سروتایپ می باشد:
  - **اگاوا (Ogawa)**
  - **اینابا (Inaba)**
  - **هیکوجیما (Hikojima)** که نادر و همچنین ناپایدار است
- سروتایپ های اگاوا و اینابا به ترتیب با آنتی سرم های اگاوا و اینابا مثبت می شوند، اما سروتایپ هیکوجیما با هر دو آنتی سرم مثبت می شود.

نقش آزمایشگاه

- آزمایشگاه های بالینی در هنگام اپیدمی ها، نقشی سرنوشت ساز و خطیر در بهداشت همگانی به عهده دارند.
- آزمایشگاه ممکن است برای تهیه خط مشی درمانی مناسب در هنگام اپیدمی تنها منبع فراهم آورنده سریع اطلاعات مورد نیاز باشد.
- آزمایشگاه در هنگام اپیدمی وبا چهار نقش اصلی دارد:
  - شناسایی اولیه ارگانیسم پدید آورنده اپیدمی
  - تعیین اولیه الگوهای حساسیت ضد میکروبی
  - پایش تغییر الگوهای حساسیت ضد میکروبی
  - مشخص کردن طول مدت و گستردگی جغرافیایی همه گیری

محیط های کشت مورد نیاز برای کشت نمونه مدفوع

۱. محیط انتخابی Thiosulfate Citrate Bile Salts (TCBS)
۲. محیط براث غنی کننده Alkaline Peptone Water (APW)
۳. محیط Sheep Blood Agar (Optiolal)

- **کشت سریع نمونه**
  - ویبریوها عموما نسبت به خشکی، قرار گرفتن در معرض نور خورشید و تغییر pH به شرایط اسیدی بسیار حساس هستند.
  - همچنین رشدشان بوسیله فلور نرمال روده یا ارگانیسم های آلوده کننده به راحتی مهار می شود.

تلقیح محیط پلیتی TCBS

۱. نمونه مدفوع تازه، سوآب مدفوع یا رکتال سوآب را روی سطح پلیت TCBS اول تلقیح کنید و به گونه ای کشت دهید که کلنی های ایزوله بدست آید.

۲. پلیت ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه دهید.

- **توجه:**
  - برای هر بیمار استفاده از یک پلیت با قطر ۱۰-۸ سانتیمتری برای هر محیط الزامیست و نباید از پلیت ۶ سانتیمتری استفاده کنید، زیرا احتمال جداسازی ویبریو کاهش می یابد.
  - از نصف کردن محیط TCBS خودداری نمایید.
  - محیط TCBS نباید اتوکلاو شود، فقط حرارت دهید تا محیط بجوشد و کاملا حل شود. اجازه دهید تا دمای ۵۰-۴۵ درجه سانتیگراد خنک شود، سپس در پلیت های استریل توزیع کنید.
  - هنگام استفاده از محیط TCBS از زمان تهیه نباید بیش از یک هفته گذشته باشد.
  - پلیت های TCBS باید به گونه ای در یخچال نگهداری شود، که از خشک شدن آنها جلوگیری گردد.

تلقیح محیط غنی کننده APW

۱. در روز اول بعد از تلقیح پلیت TCBS، نمونه مدفوع تازه، سوآب مدفوع یا رکتال سوآب را در محیط APW تلقیح کرده، سپس سواب را دور بیندازید.

۲. محیط APW را به مدت ۸-۶ ساعت با درپوش شل در ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.

۳. بعد از ۸-۶ ساعت از سطح محیط براث بدون مخلوط کردن (به دلیل حرکت بیشتر *ویبریو کلرا* در مقایسه با *اشریشیا کلای* و تراکم *ویبریو* در سطح براث) یک یا دو لوپ برداشته، روی پلیت TCBS دوم کشت دهید، به طوری که کلنی های جدا از هم بدست آید.

- **توجه:** اگر نتوانستید محیط آب پپتونه قلیایی را بعد از ۸-۶ انکوباسیون بر روی محیط TCBS کشت دهید، یک یا دو لوپ از محیط آب پپتونه را پس از ۱۸ ساعت در یک لوله آب پپتونه قلیایی جدید ساب کالچر نموده و این لوله را پس از ۸-۶ ساعت انکوباسیون در محیط TCBS دوم ساب کالچر نمایید.

۴. پلیت TCBS دوم را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه کنید. در صورت عدم رشد یا رشد ضعیف، انکوباسیون را تا ۴۸ ساعت ادامه دهید.

نکاتی در مورد APW

- براث غنی کننده ساده ایست که برای مواقعی که تعداد کم میکروارگانیسم در نمونه پیش بینی می شود، مورد استفاده قرار می گیرد (برای مثال در مواقع نقاهت بیماری).
- pH بالای محیط رشد باکتری های کومنسال را مهار می کند، در ضمن اینکه موجب تکثیر ویبریو کلرا می شود.
- حاوی ۱ درصد پپتون و ۱ درصد NaCl، با pH ۸/۴-۸/۶
- pH محیط APW باید بعد از اتوکلاو نمودن و خنک شدن آن تا دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با استفاده ازدستگاه pH متر استاندارد و کالیبره اندازه گیري شود.
- در صورتی که pH خارج از این محدوده باشد، معمولاً با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) تنظیم نمایید.
- محیط APW باید در لوله های درپوش دار محکم تهیه و نگهداری شود. در صورتی که از لوله های درپنبه استفاده می کنید، روی پنبه را با پارافیلم کاملا" بپوشانید، تا از تبخیر و تغییر pH محیط جلوگیری شود.
- در محیط آب پپتونه می توان مدفوع تازه، سواب مدفوع یا سواب رکتال را تلقیح نمود. مدفوع تلقیح شده نباید از ده درصد حجم آب پپتونه بیشتر باشد.

بررسی محیط TCBS

- پلیت های TCBS را از نظر وجود کلنی های شبیه *ویبریو کلرا* بررسی نمایید.
- *V. cholerae* سوکروز را تخمیر کرده و کلنی های زرد رنگ، نرم، به قطر ۲ تا ۴ میلیمتر با مرکز مات و حاشیه براق ایجاد می کند.
- همچنین گونه های زیر سوکروز را تخمیر کرده و کلنی های زرد رنگ مشابه *ویبریو کلرا* ایجاد می کنند:

V. alginolyticus, V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. furnissii, V. harveyi, V. metschnikovii, some V. vulnificus

- سایر ویبریوهایی که از نظر بالینی مهم هستند، کلنی های سبز تا آبی رنگ ایجاد می کنند:

V. parahaemolyticus, V. mimicus, V. damsel, most V. vulnificus

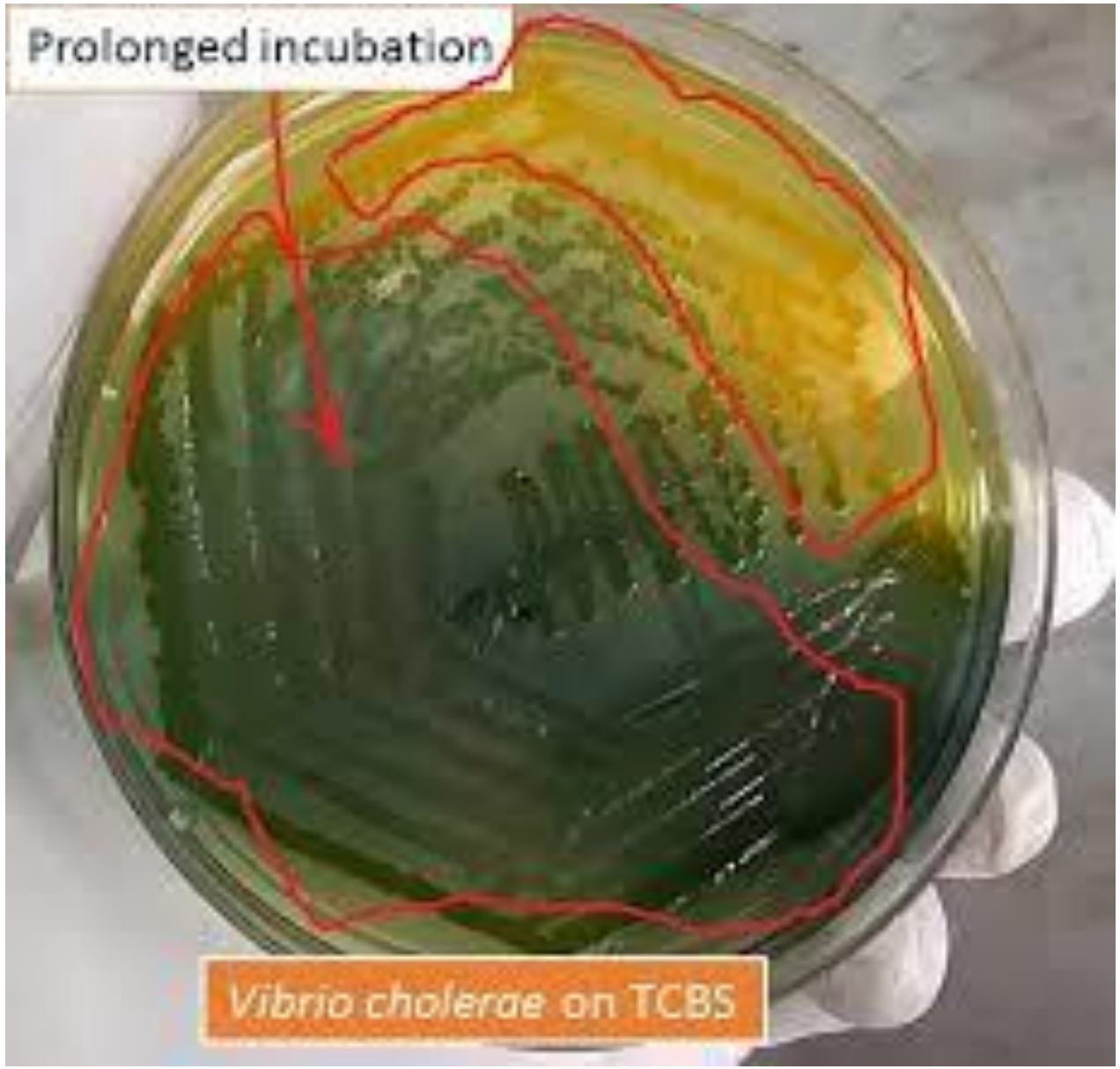
محدودیت های استفاده از محیط TCBS

- رشد برخی از *Vibrio* spp. روی این محیط مهار می شود.
- سویه های *Proteus* spp. تخمیر کننده سوکروز روی این محیط کلنی های زرد رنگ شبیه ویبریو تولید می کنند.
- رشد سایر باکتری های روده ای مهار می شود، اما اگر رشد کنند، کلنی های آبی تا شفاف ایجاد می کنند.
- *Pseudomonas* spp. ممکن است روی این محیط رشد کنند.
- *Enterococci* نیز ممکن است روی این محیط رشد کنند.
- محیط TCBS برای انجام آزمایش اکسیداز محیط نامناسبی است.

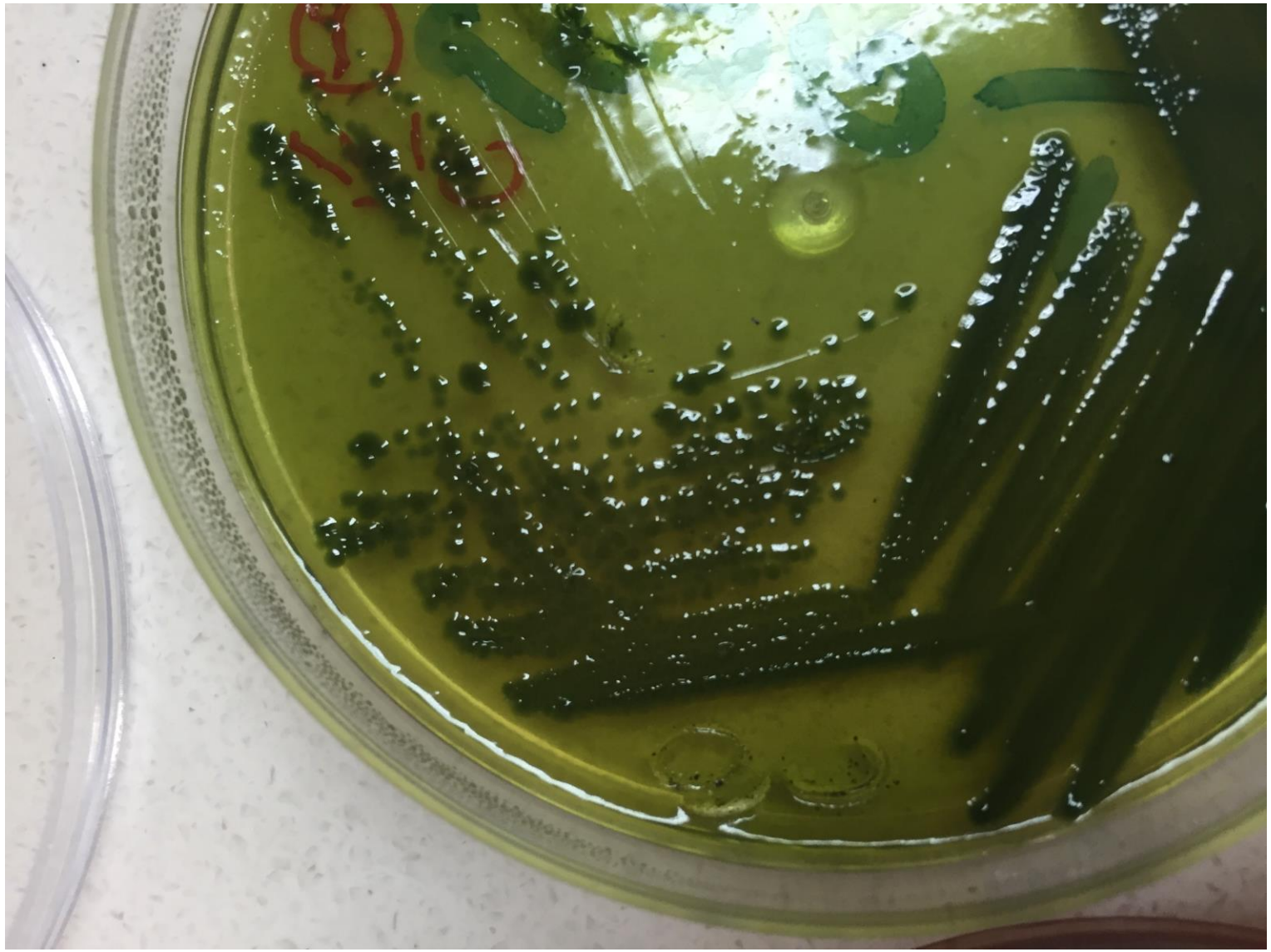


TCBS

کلنی های *ویبریو کلرا* زرد رنگ، نرم، به قطر ۲ تا ۴ میلیمتر با مرکز مات و حاشیه براق


Prolonged incubation
Vibrio cholerae on TCBS

V. cholerae روی محیط TCBS با کیفیت نامناسب



بررسی محیط Sheep Blood Agar

- استفاده از این محیط در کشت نمونه های اسهالی مشکوک به *ویبریو*، *آئروموناس* و *پلزیوموناس* توصیه می شود (الزامی نیست)، برای:
  - مشاهده همولیز
  - انجام تست اکسیداز
  - ساب کالچر به محیط KIA
  - ساب کالچر به محیط SIM
- *V. cholerae*: کلنی ها نرم، محدب، دارای قوام خامه ای، خاکستری-سفید
- گاهی کلنی های خشن (Rough) مشاهده می شوند، که چروکیده بوده و به آگار می چسبند.
- همولیز روی محیط Sheep blood agar و انکوباسیون در شرایط هوازی به مدت ۲۴-۱۸ ساعت (حداکثر ۲۴ ساعت):
  - *ویبریو کلرا* نان همولیتیک

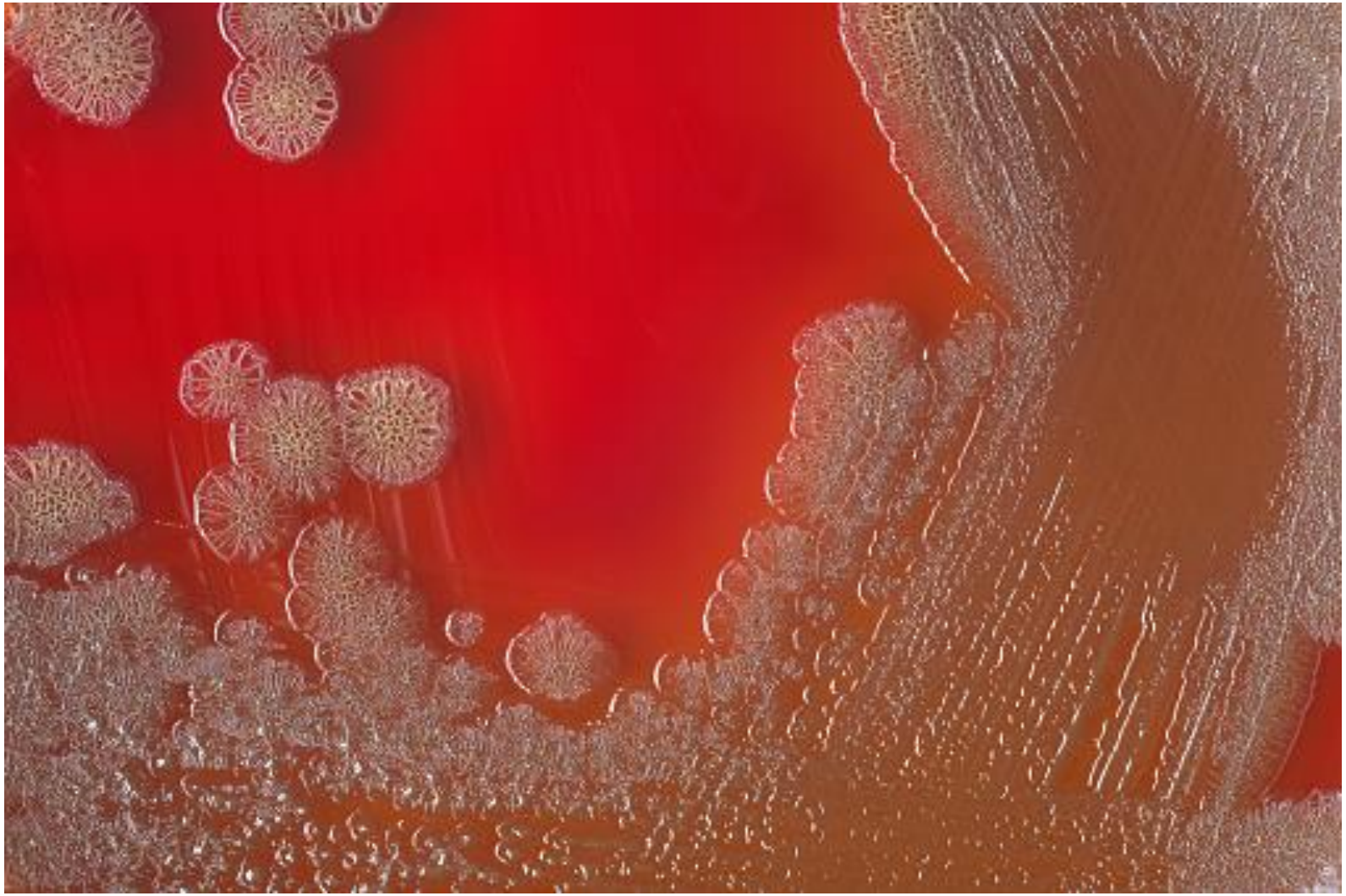
یا

  - *ویبریو کلرا* همولیتیک



محیط Sheep Blood Agar:

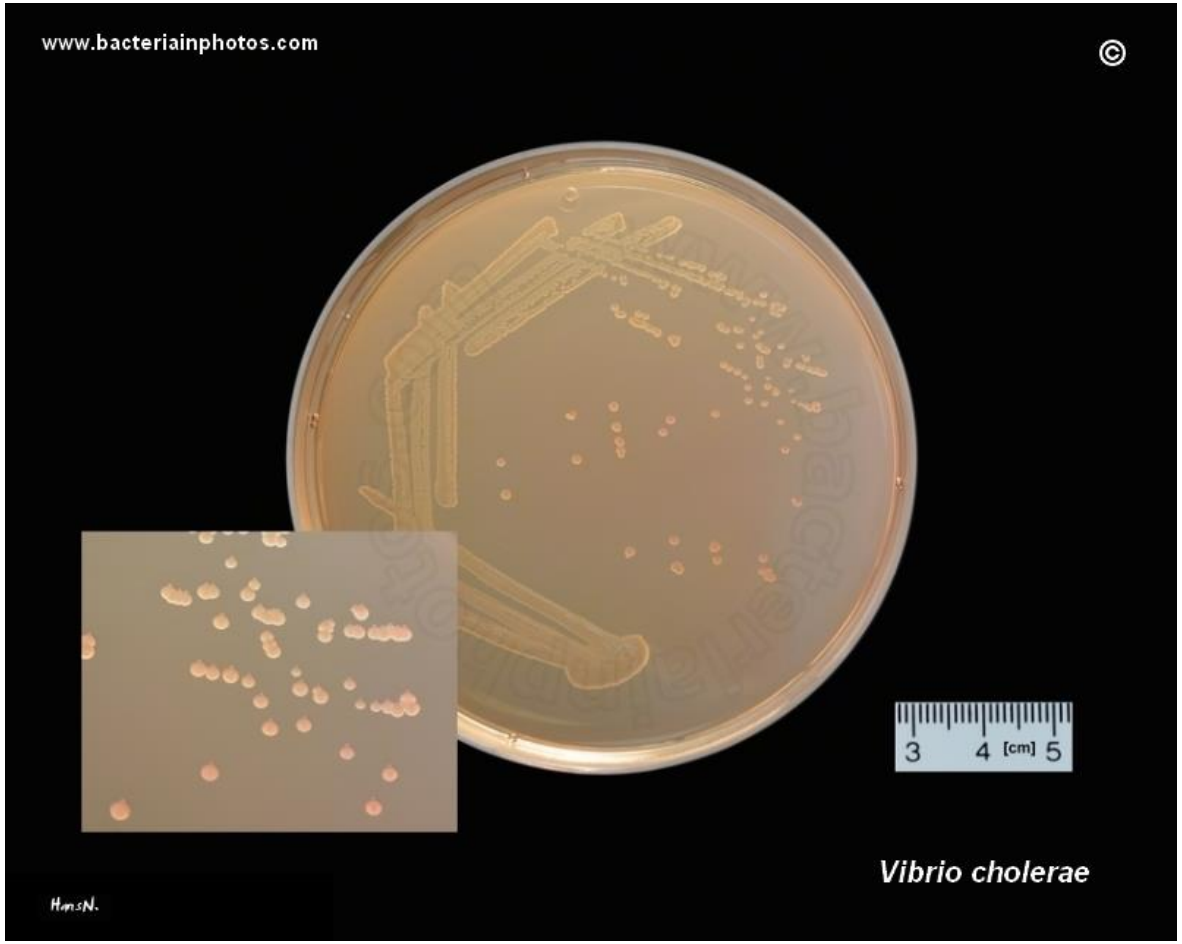
کلنی ها نرم، محدب، دارای قوام خامه ای، خاکستری-سفید



محیط Sheep Blood Agar

گاهی کلنی های خشن (Rough) مشاهده می شوند، که به آگار می چسبند.

MacConkey Agar



کلنی های کوچک لاکتوز منفی

آزمایش های تشخیصی *ویبریو کلرا*

- **حداقل آزمایش های تشخیصی *ویبریو کلرا* O1:**
  - **آزمایش های غربالگری:**
    - KIA (Kligler Iron Agar) (محیط TSI نمی تواند جایگزین محیط KIA شود)
    - SIM (Sulfide-Indole-Motility)
    - Oxidase
  - **آزمایش های سرولوژی:**
    - Antiserum Test
      - *V. cholerae* Polyvalent O1 Antiserum
      - *V. cholerae* Serotype Ogawa Antiserum
      - *V. cholerae* Serotype Inaba Antiserum

KIA (Kligler Iron Agar)

- محیط KIA حاوی: دو قند گلوکز (۰/۱%) و لاکتوز (۱%)، معرف pH فنل رد و ferrous sulfate برای تعیین تولید H2S
- محیط کشت KIA بصورت شیبدار در لوله تهیه می شود:
  - به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت نمود که طول سطح شیبدار و عمق محیط کشت در لوله مساوی و حدود ۳ سانتی متر باشد.
- قبل از ذخیره کردن و قبل از استفاده محیط را از نظر یخ زدگی، آلودگی، خشک شدن، ترک و یا حباب بررسی نمایید. لوله های زیر را دور بریزید:
  - لوله های دارای حباب و یا ترک خوردگی در آگار
  - لوله هایی که به رنگ قرمز نیستند
  - لوله هایی که عمق و سطح مساوی (۳ cm) ندارند

- واکنش ویبریو کلرا بر روی این محیط: Alk/Acid {سطح قلیایی (قرمز) و عمق اسیدی (زرد)} بدون تولید گاز و بدون H2S

KIA (Kligler Iron Agar)

- **روش انجام آزمایش:**

۱. محیط را از یخچال خارج کرده و اجازه دهید به دمای اتاق برسد. با استفاده از نیدل استریل، از مرکز یک کلنی زرد رنگ کاملا ایزوله و تازه (کشت ۲۴- ۱۸ ساعته) روی محیط TCBS بردارید.

۲. ابتدا نیدل را در عمق محیط تا فاصله ۳ تا ۵ میلی متری از عمق لوله فرو برده، سپس نیدل را خارج کرده و به صورت مارپیچ در امتداد سطح شیبدار روی محیط را تلقیح نمایید (یا برعکس).

۳. درپوش لوله را به صورت شل ببندید (محکم نبندید).

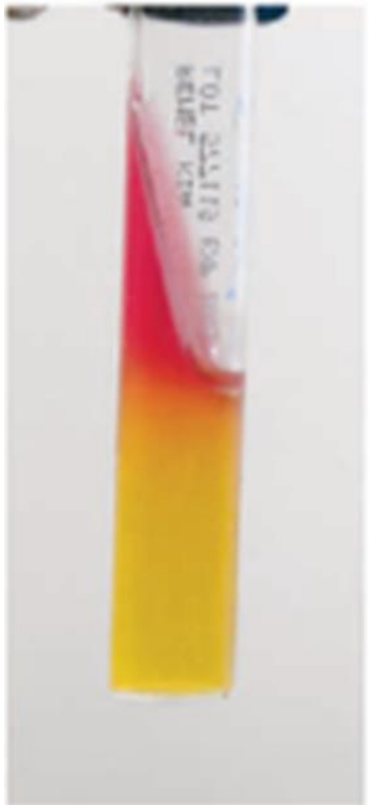
- درپوش تمام لوله های تست های بیوشیمیایی پیش از انکوباسیون شل شوند، این موضوع به ویژه در مورد محیط KIA اهمیت دارد. اگر درپوش ها سفت باشند، در لوله شرایط بی هوازی ایجاد شده، واکنش نادرست رخ می دهد و واکنش مشخصه ویبریو کلرا ممکن است مشاهده نشود.

۴. محیط کشت را به مدت ۲۴- ۱۸ ساعت در ۳۷ °c- ۳۵ در مجاورت هوا انکوبه نمایید.

۵. واکنش هاي توليد شده بوسيله ارگانيسم مورد آزمايش را در سطح و عمق لوله مشاهده نماييد. محيط را ازنظر توليد گاز و رسوب سولفيد هيدروژن بررسی کنيد.

- تفسیر نتیجه حاصل از واکنش های تخمیری قندها در لوله، در مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت (نه زودتر نه دیرتر) قابل اطمینان می باشد.

KIA (Kligler Iron Agar)



واکنش *ویبریو کلرا* در این محیط

- **مشاهدات:**
  - واکنش اسیدی: زرد
  - واکنش قلیایی: قرمز
  - تولید گاز: حباب ها، ایجاد ترک و یا جابجا شدن محیط
  - تولید H2S: ایجاد رنگ سیاه در تمام محیط، ایجاد حلقه سیاه در حد فاصل عمق لوله و سطح شیبدار یا ایجاد رسوب سیاه در ته لوله
- **تفسیر نتایج:**
  - A/A: تخمیر گلوکز و لاکتوز
  - K/A: فقط تخمیر گلوکز (NLF)
  - K/K: عدم تخمیر قندها (غیرتخمیری ها)
- **واکنش *ویبریو کلرا* :**
  - واکنش ویبریو کلرا بر روی این محیط: Alk/Acid {سطح قلیایی (قرمز) و عمق اسیدی (زرد)} بدون تولید گاز و بدون H2S

KIA (Kligler Iron Agar)

- **محدوديت ها**

- براي افزايش شرايط قلياييِ سطح شيبدار بايد با بستن درپوش لوله بصورت شل، اجازه داد كه تبادل آزاد هوا صورت گيرد. اگر درپوش لوله محكم بسته شود، واكنش اسيدي كه ناشی از تخمير فقط گلوكز می باشد، سطح شيبدار محيط را درگير خواهد كرد (واكنش Alk/Acid به اشتباه Acid/Acid مشاهده می شود).
- قرائت نتيجه آزمايش قبل از ۱۸ ساعت، باعث مشاهده و تفسير اشتباه حالت اسيدی در سطح شيبدار می گردد.

SIM (Sulfide-Indole-Motility)

- محیط کشت نیمه جامد SIM بصورت عمقی در لوله تهیه می شود:
  - مقدار حدود ۵ mL در لوله های ۱۳×۱۰۰ mm توزیع کنید، و اجازه دهید بعد از اتوکلاو شدن به صورت ایستاده خنک شوند.
  - عمق محیط SIM در هر لوله باید حداقل ۳ cm باشد.
  - برای نگهداری محیط SIM برای جلوگیری از تبخیر محیط، درپیچ لوله های حاوی محیط باید محکم بسته شود یا در پنبه ای باید با پارافیلم پوشانده شود.

- **روش انجام آزمایش:**

۱. محیط را از یخچال خارج کرده و اجازه دهید به دمای اتاق برسد.
۲. با استفاده از نیدل استریل، از مرکز يك كلني كاملا ایزوله و تازه (کشت ۲۴- ۱۸ ساعته) روی محیط TCBS بردارید.
۳. نیدل را در مرکز محیط تا عمق حدود ۱/۵ cm در محیط فرو ببرید (حدود دو سوم محیط)، و سپس از همان خط تلقیح اولیه از محیط خارج کنید.
۴. درپوش لوله را شل ببندید، تا هوا در محیط جریان داشته باشد.
۵. لوله را در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در مجاورت هوا انکوبه کنید.
۶. محیط را از نظر تولید H2S، اندول و حرکت بررسی نمایید.

SIM (Sulfide-Indole-Motility)

- **تفسیر نتایج:**
  - H2S
    - مثبت: وجود هر گونه رنگ سیاه در محیط، در طول خط تلقیح یا در کل عمق محیط
    - منفی: عدم تشکیل رنگ سیاه
  - اندول
    - ۳ قطره معرف کواکس را از کناره لوله به محیط اضافه کرده و تغییر رنگ را در سطح محیط بررسی نمایید.
      - مثبت: ایجاد رنگ قرمز-قهوه ای تا قرمز-ارغوانی در مدت ۲۰ ثانیه
      - منفی: بی رنگ یا زرد کمرنگ
  - حرکت
    - مثبت: انتشار رشد به بیرون از خط کشت و کدورت محیط
    - منفی: رشد باکتری فقط در طول خط کشت و شفاف بودن محیط (شبیه محیط تلقیح نشده)
- توجه:
  - اگر تفسیر آزمایش حرکت مشکل باشد، آن را با یک محیط تلقیح نشده (کنترل) مقایسه نمایید.

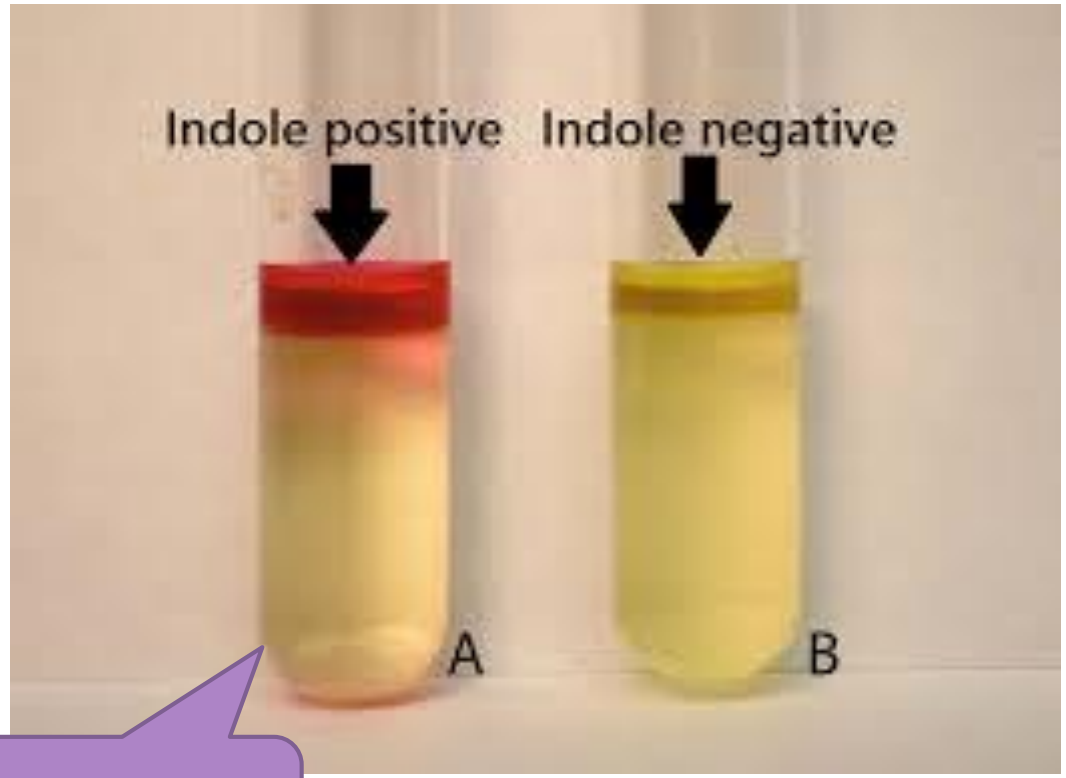
Indole (Kovacs) reagent

- **کنترل کیفیت معرف کواکس:**
  - هر سری ساخت و خرید قبل از استفاده، سپس هر ۳ ماه
  - معرف کواکس، زرد کمرنگ است. در صورت تغییر رنگ باید دور ریخته شود.
  - معرف باید در ظرف شیشه ای قهوه ای رنگ در یخچال نگهداری شود.
  - در آزمایش QC در صورت مشاهده واکنش ضعیف، معرف باید دور ریخته شود.
  - سویه های QC:

QC organism	ATCC no.	Expected Result
E. coli	25922	+ (ارغوانی رنگ)
K. pneumoniae	13883	- (بدون تغییر رنگ)

فرم ثبت نتیجه کنترل کیفیت معرف کواکس

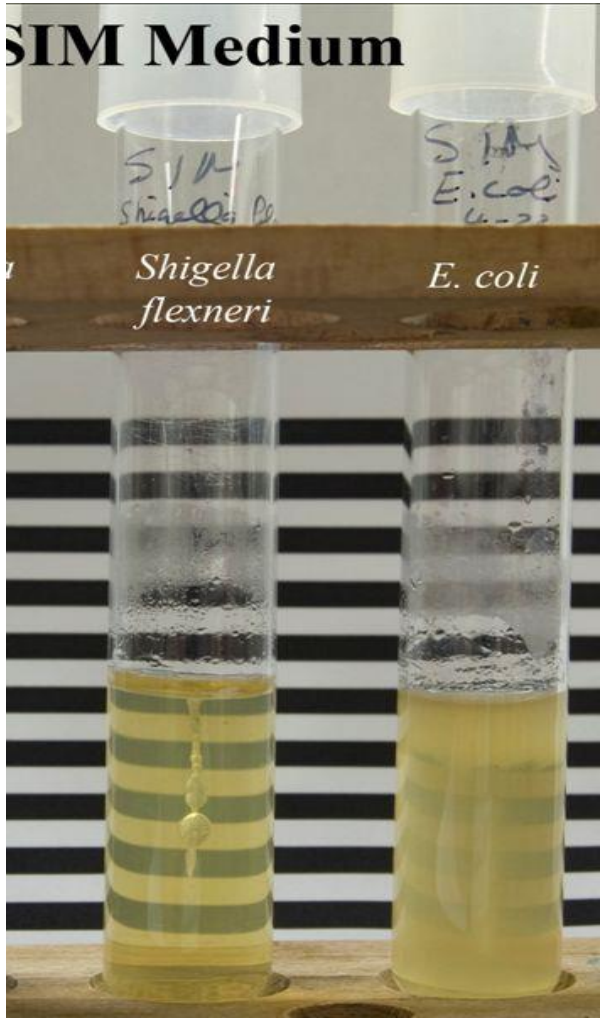
سری ساخت	تاریخ انقضا	تولید کننده	مشخصات فیزیکی	نتایج آزمایش با سویه های کنترل کیفی		نتیجه نهایی	اقدام اصلاحی	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش
				E. coli ATCC 25922	*K. pneomoniae* ATCC 13883				



V. cholerae



V. cholerae


SIM Medium
Shigella flexneri
E. coli

Oxidase test

- محلول اکسیداز (تترامتیل پارافنیلن دي آمین دي هیدروکلراید)
- توجه: فرمول های دیگری نیز وجود دارد، اما کواکس حساس ترین معرف است، پایدارتر بوده و نسبت به مشتق دی متیل آن کمتر سمی است.
  - برای تهیه محلول ۱٪ اکسیداز، ۰/۱ گرم از پودر تترامتیل پارافنیلن دي آمین دي هیدروکلراید را در ۱۰ml آب مقطر استریل حل کنید. بخوبی مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه آن را درجای ثابتی قرار دهید (از حرارت دادن خودداری نمایید).
  - معرف را بصورت روزانه تهیه کنید.
  - همچنین می توانید معرف را داخل لوله های درپیچ دار پوشیده شده با فویل به اندازه های مساوی تقسیم کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره نمایید. قبل از استفاده معرف را از فریزر خارج نموده، بگذارید ذوب شود. باقیمانده هر روز را دور بریزید.
  - دیسک ها یا نوارهای کاغذی آغشته به معرف (آماده مصرف تجاری) نگهداری شده در یخچال

Oxidase Test

- **روش انجام آزمایش:**

۱. مربع کوچکی از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ را در ظرف پتری قرار دهید و با ۱ یا ۲ قطره از معرف اکسیداز آماده شده مرطوب نمایید، یا نوار یا دیسک اکسیداز آماده مصرف را در ظرف پتری قرار دهید.

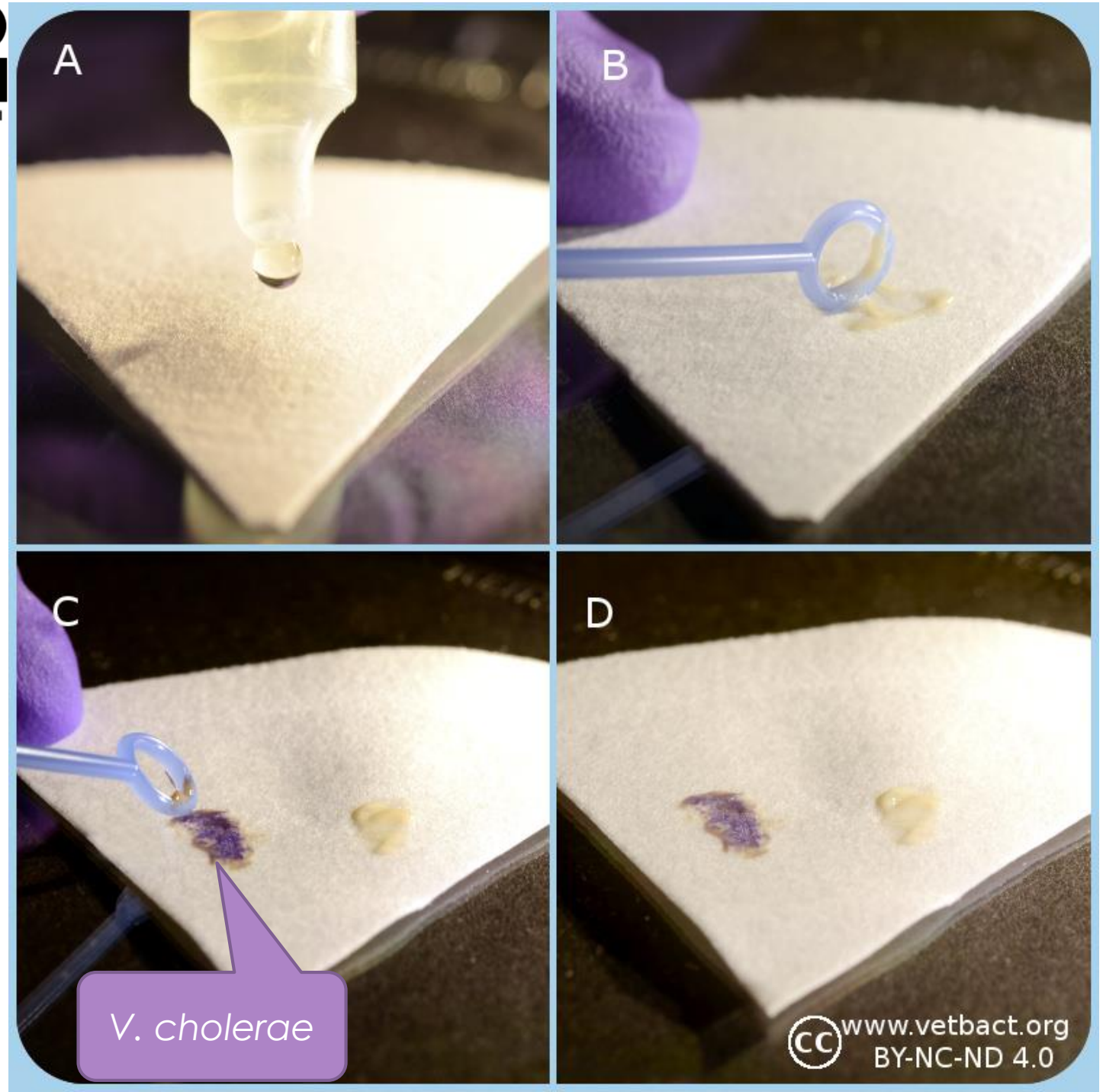
- توجه: مطابق دستورالعمل سازنده عمل کنید. ممکن است مطابق دستورالعمل بعضی سازندگان نیاز به مرطوب نمودن دیسک باشد.

۲. از کلنی خالص روی محیط KIA یا Blood Agar با استفاده از اپلیکاتور برداشته و بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف اکسیداز پخش کنید.

۳. تغییر رنگ کاغذ به بنفش را در محل تلقیح در مدت ۱۰ ثانیه مشاهده نمایید.

Oxidase Test

- **تفسیر:**
  - نتیجه مثبت: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۱۰ ثانیه
  - نتیجه تاخیری: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۶۰-۱۰ ثانیه (باید تست هاي بيشتري انجام شود، زيرا احتمالاً متعلق به خانواده انتروباکتریاسه نمي باشد.)
  - نتیجه منفی: عدم تغییر رنگ معرف یا ایجاد صورتی کمرنگ در مدت ۱۰ ثانیه
  - توجه: به دستورالعمل سازنده توجه شود.



Oxidase Test



Oxidase Test

- **کنترل کیفیت:**
- هر سری ساخت جدید پودر معرف یا دیسک آماده مصرف تجاری قبل از استفاده
- و سپس هر روزي کاری
- هنگامیکه محلول معرف برنگ بنفش کم رنگ تغییر کند یا دیسک کاغذی در حال تیره شدن است، از آن استفاده نکنید.
- سویه کنترل مثبت: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- سویه کنترل منفي: *Escherichia coli* ATCC 25922

فرم ثبت نتیجه کنترل کیفیت معرف اکسیداز

سری ساخت	تاریخ انقضا	تولید کننده	مشخصات فیزیکی	نتایج آزمایش با سویه های کنترل کیفی		نتیجه نهایی	اقدام اصلاحی	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش
				E. coli ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853				

Oxidase Test

- **محدودیت ها:**
- برای جلوگیری از ایجاد نتایج کاذب:
  - از لوپ استیل یا نیکروم برای برداشتن کلنی استفاده نکنید. زیرا در اثر استریل کردن لوپ با شعله، اکسیداسیون سطحی ایجاد شده و نتیجه مثبت کاذب بدست می آید.
  - از کلنی هایی که بر روی محیط های حاوی رنگ (مانند TCBS) رشد کرده اند، برای انجام این تست استفاده نکنید. نتیجه منفی کاذب ایجاد می شود.
  - رعایت زمان قرائت واکنش برای انجام دقیق تست بسیار مهم است.

تشخیص سرولوژی *ویبریو کلرا* O1

- استفاده از آنتی سرم ها یکی از سریع ترین و اختصاصی ترین روش های تشخیصی *V. cholerae* O1 می باشد.
- بعد از تشخیص بیوشیمیایی ایزوله به عنوان *ویبریو کلرا*، آزمایشگاه باید با آنتی سرم های اختصاصی *ویبریو کلرا* آزمایش انجام دهد، برای:
  - تعیین سروگروه (این که ایزوله سروگروه O1 می باشد یا خیر)
  - تایید تشخیص *ویبریو کلرا* O1
  - تعیین سروتایپ

آزمایش آنتی سرم
۱- تعیین سروگروه

- **روش انجام آزمایش:**

۱. یک لام تمیز برداشته و روی یک سمت آن یک قطره سرم فیزیولوژی برای بررسی اتوآگلوتیناسیون یا خشن بودن کلنی ها (به عنوان کنترل منفی) قرار دهید.

۲. سمت دیگر لام یک قطره آنتی سرم *V. cholerae* Poly O1 قرار دهید.

۳. بوسیله لوپ، آنس یا اپلیکاتور چوبی استریل از کلنی های خالص و ۲۴-۱۸ساعته ایزوله مورد آزمون از روی محیط غیر انتخابی مانند Blood agar یا KIA برداشته، ابتدا در قطره سرم فیزیو لوژی و سپس در قطره آنتی سرم سوسپانسیون یکنواختی تهیه کنید.

- **توجه ۱:** به هیچ وجه از محیطهاي انتخابي مانند MAC یا TCBS براي انجام آزمايش آنتي سرم استفاده نكنيد، زيرا نتايج گمراه كننده اي بدست مي آيد. **استفاده از کلنی روی محیط TCBS منجر به نتایج منفی کاذب می شود.**
- **توجه ۲:** قبل از انجام آزمایش با آنتی سرم، روش انجام آزمایش در دستورالعمل همراه (بروشور) تولید کننده آنتی سرم باید به دقت مطالعه شود. مطابق دستورالعمل بعضی از تولیدکنندگان، باید یک قطره سرم فیزیولوژی در یک سمت لام و قطره دیگری سرم فیزیولوژی در سمت دیگر لام بریزید. از کلنی مورد آزمون سوسپانسیون یکنواختی در هر دو قطره تهیه نموده، یک قطره آنتی سرم به یکی از قطره های سرم فیزیولوژی اضافه کنید.

۴. لام را به مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه (با توجه به دستورالعمل همراه آنتی سرم، این زمان متفاوت است) به صورت دورانی حرکت دهید.

۵. تشکیل ذرات آگلوتیناسیون را در زیر نور کافی (چراغ مطالعه) با پس زمینه تیره به دقت بررسی نمایید. مطمئن شوید که قطره سوسپانسیون سرم فیزیولوژی فاقد ذرات آگلو تیناسیون باشد.

آزمایش آنتی سرم
۱- تعیین سروگروه

- **تفسیر:**
  - واکنش مثبت: وجود ذرات آگلوتیناسیون در قطره آنتی سرم و وجود نداشتن ذرات آگلوتیناسیون در قطره سرم فیزیولوژی (کنترل منفی) در مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه، بر اساس دستورالعمل سازنده
    - **توجه:** مطابق دستورالعمل سازنده آنتی سرم ایجاد ذرات آگلوتیناسیون ضعیف بعد از ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه فاقد ارزش می باشد.
  - واکنش منفی: وجود نداشتن ذرات آگلوتیناسیون در قطره آنتی سرم و وجود نداشتن ذرات آگلوتیناسیون در قطره سرم فیزیولوژی (کنترل منفی) در مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه، بر اساس دستورالعمل سازنده
    - **توجه:** قطره سرم فیزیولوژی (قطره کنترل منفی) در هر دو واکنش مثبت و منفی باید فاقد ذرات آگلوتیناسیون باشد، تا نتیجه قطره آنتی سرم قابل اطمینان محسوب شود.
  - آگلوتیناسیون خود به خودی (اتوآگلوتیناسیون): وجود ذرات آگلوتیناسیون در قطره سرم فیزیولوژی، که به علت خشن بودن کلنی (Rough) ایجاد می شود. در این صورت تشکیل ذرات آگلوتیناسیون در قطره آنتی سرم فاقد ارزش است.
    - **توجه:** گاهی استفاده از محیط های حاوی قند زیاد مانند TSI یا KIA می تواند باعث ایجاد آگلوتیناسیون خود به خودی شود. در این موارد کلنی را بر روی محیط بدون قند مانند بلاد آگار کشت داده و آزمایش آنتی سرم را از روی محیط بلاد آگار تکرار نمایید.

آزمایش آنتی سرم
۱- تعیین سروگروه

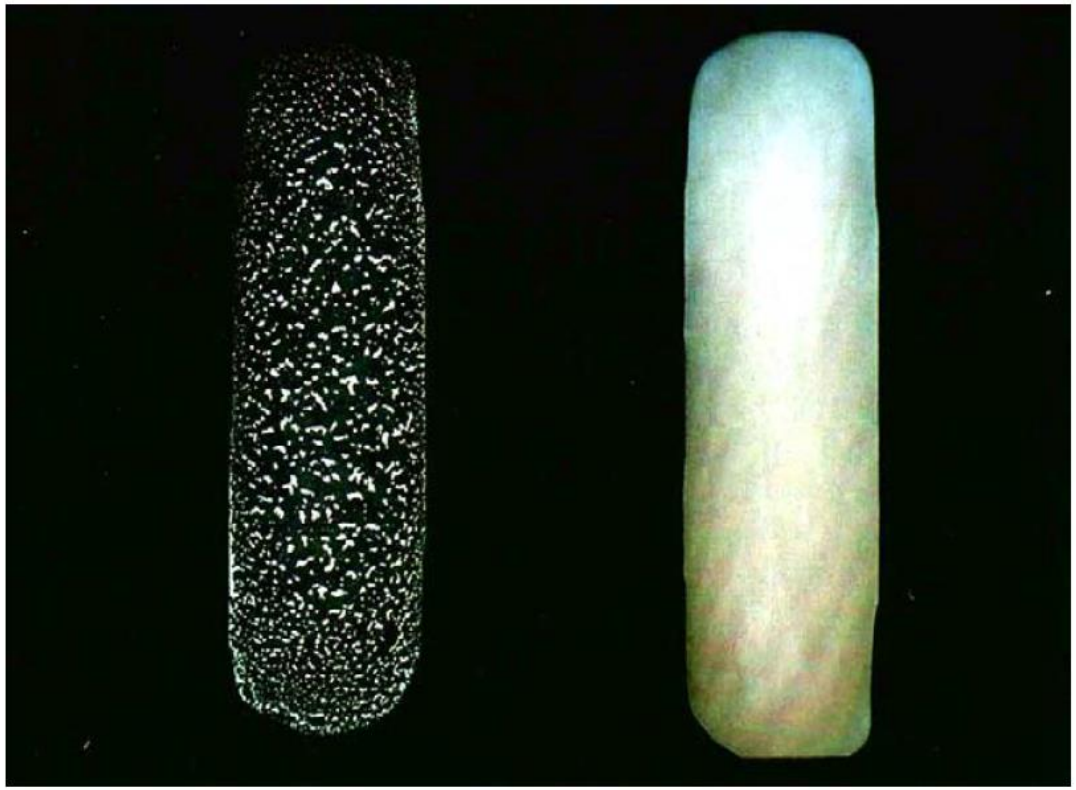
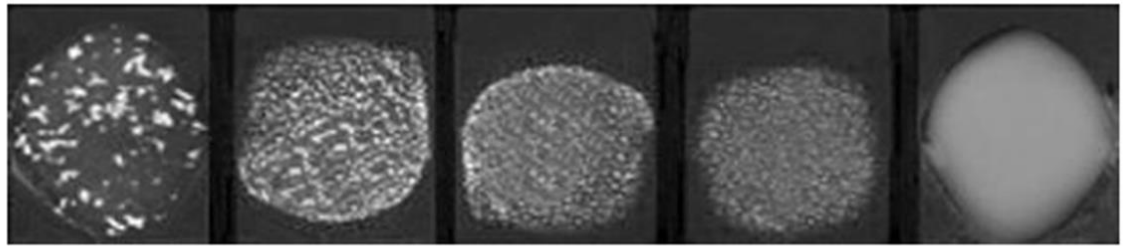


Figure V1-1. Antisera to the O1 serogroup of *V. cholerae* will agglutinate homologous organisms (left). A normal serum or saline control (right) does not show agglutination

آزمایش آنتی سرم
۱- تعیین سروگروه

Score and record the results as follows:

4+	All organisms are clumped and the supernatant, or suspending fluid is clear
3+	About 75% agglutination, the supernatant fluid is slightly cloudy
2+	About 50% agglutination, the supernatant fluid is moderately cloudy
1+	About 25% agglutination, the supernatant fluid is cloudy
Tr	Trace amount of agglutination present
Negative	No agglutination apparent and suspension remains homogenous.



4+ **3+** **2+** **1+** **Negative**

کنترل کیفیت آنتی سرم

- هر سری ساخت و خرید، و سپس هر شش ماه یک بار
- بررسی چشمی یک قطره از آنتی سرم روی لام، آنتی سرم باید شفاف بوده و فاقد هر گونه ذره باشد.
- آزمایش بروش آگلوتیناسیون بر روی لام
- آزمایش حداقل یک سویه کنترل مثبت و یک سویه کنترل منفی باید برای بررسی خصوصیت و شدت آگلوتیناسیون آنتی سرم
  - آزمون کنترل کیفیت آنتی سرم با سویه های کنترل باید مطابق روش انجام آزمایش و کاملا منطبق با دستورالعمل شرکت سازنده باشد.
- ثبت نتایج همه واکنش ها

آزمایش آنتی سرم
۲- تعیین سروتایپ

- ایزوله های سروگروه O1 *ویبریو کلرا* به ۳ سروتایپ اینابا، اگاوا و هیکوجیما (بسیار نادر) تقسیم می شوند.
- تشخیص سروتایپ بر اساس آگلوتیناسیون با آنتی ژن های O اختصاصی با آنتی سرم های مونوالان اینابا و اگاوا صورت می گیرد.

Identifying characteristics of serotypes of *V. cholerae* serogroup O1

Serotype	Major O factors Present	Agglutination in absorbed serum	
		Ogawa	Inaba
Ogawa	A, B	+	-
Inaba	A, C	-	+
Hikojima	A, B, C	+	+

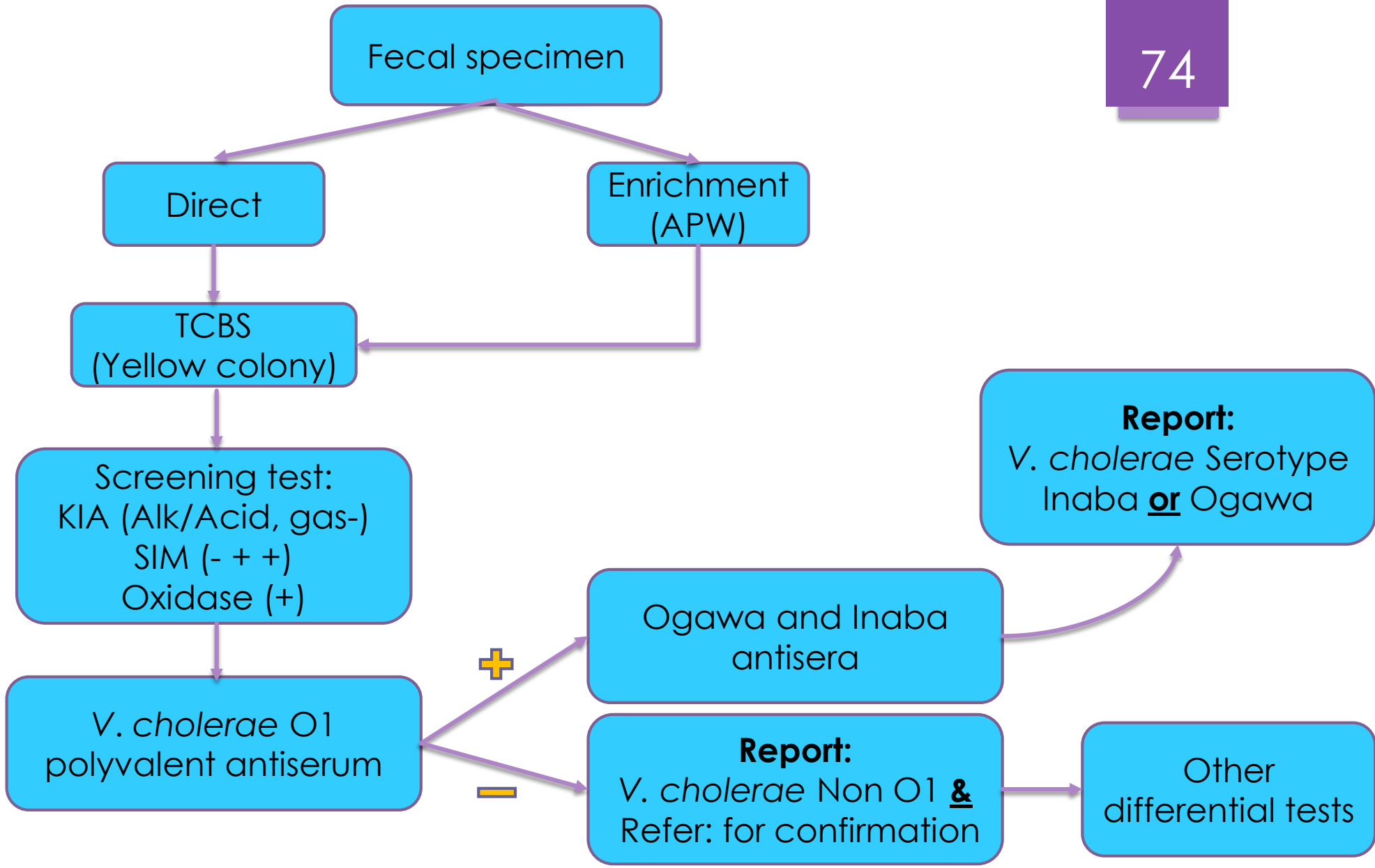
آزمایش آنتی سرم
۲- تعیین سروتایپ

- در صورت ایجاد واکنش مثبت با آنتی سرم پلی والان O1، آزمایش با آنتی سرم های مونووالان اینابا و اگاوا به طور **همزمان** انجام شود.

Vibrio cholerae O Antisera			Report
Poly O1	**Inaba**	**Ogawa**	
+	+	-	***V.cholerae*** **serotype Inaba**
+	-	+	***V.cholerae*** **serotype Ogawa**
+	+	+	***V.cholerae*** **Serotype Hikojima**
-	NA	NA	***V.cholerae*** **Non O1**

آزمایش آنتی سرم
۲- تعیین سروتایپ

- **توجه:**
- آنتی سرم های اینابا و اگاوا هرگز نباید با سویه هایی که با آنتی سرم O1 منفی هستند، استفاده شوند.
- ایزوله هایی که با آنتی سرم Poly O1 واکنش آگلوتیناسیون ضعیفی دارد، اما با آنتی سرم های اینابا یا اگاوا آگلوتیناسیون ندارند، سروگروه O1 نمی باشند.
- سویه هایی که با هر دو آنتی سرم اینابا و اگاوا خیلی شدید و همزمان با یکدیگر آگلوتینه دارند، بسیار نادر هستند. اگر چنین واکنشی مشاهده شود:
  ۱. آنتی سرم ها را از نظر ظاهری بررسی نمایید، که فاقد هر گونه ذره، رسوب و کدورت باشد.
  ۲. در صورت وجود نداشتن مشکل ظاهری آنتی سرم، سویه را برای آزمایش های بیشتر به آزمایشگاه مرجع ارسال نمایید.



Procedure for recovery of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens

تست های تکمیلی

- در صورت عدم مشاهده واکنش آگلوتیناسیون با آنتی سرم پلی والان O1 (نتیجه منفی)، ایزوله مورد آزمون نباید با آنتی سرم های مونو والان آزمایش شود.
- در صورت استفاده از حداقل آزمایش های غربالگری (KIA, SIM, Oxidase) و واکنش منفی با آنتی سرم پلی والان *ویبریو کلرا*، باید تست های تشخیصی تکمیلی انجام شود (بر اساس امکانات تشخیصی آزمایشگاه)، برای:
  - اطمینان از تشخیص *V. cholerae* Non O1
  - افتراق از سایر گونه های *ویبریو* (مانند *V. fluvialis, V. alginolyticus*, ...)
  - افتراق از *Aeromonas* spp.
  - تشخیص *Plesiomonas shigelloides*

Key Biochemical and Physiologic Characteristics of *Vibrio* spp. and *Grimontii hollisae*

Species	Oxidase	Indole	Gas From Glucose	Lactose	Sucrose	Lysine Decarboxylase[a]	Arginine Dihydrolase[a]	Ornithine Decarboxylase[a]	Growth in 0% NaCl[b]	Growth in 6% NaCl[b]	TCBS[c] Growth	Colony on TCBS[c]
Grimontii hollisae	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	Very poor	Green
Vibrio alginolyticus	+	V	–	–	+	+	–	V	–	+	Good	Yellow
Vibrio cholerae	+	+	–	V	+	+	–	+	+	V	Good	Yellow
Vibrio cincinnatiensis[d]	+	V	–	–	+	V	–	–	–	+	Very poor	Yellow
Photobacterium damsela	+	–	–	–	–	V	+	–	–	+	Reduced at 36°C	Green[e]
Vibrio fluvialis	+	V	–	–	+	–	+	–	–	+	Good	Yellow
Vibrio furnissii	+	V	+	–	+	–	+	–	–	+	Good	Yellow
Vibrio harveyi	+	+	–	–	V	+	–	–	–	+	Good	Yellow
Vibrio metschnikovii	–	V	–	V	+	V	V	–	–	V	May be reduced	Yellow
Vibrio mimicus	+	+	–	V	–	+	–	+	+	V	Good	Green
Vibrio parahaemolyticus	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	Good	Green[f]
Vibrio vulnificus	+	+	–	(+)	–	+	–	+	–	+	Good	Green[g]

[a]1% NaCl added to enhance growth.
[b]Nutrient broth with 0% or 6% NaCl added.
[c]Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar.
[d]Ferments myoinositol.
[e]5% yellow.
[f]1% yellow.
[g]0% yellow.
+, >90% of strains are positive; –, >90% of strains are negative; (+), delayed; V, variable.

تست های تکمیلی

- String test
- Salt broths
- Esculin hydrolysis
- Decarboxylase/dihydrolase reactions
- Carbohydrates fermentation
- Voges-Proskauer test
- DNase
- Gelatin liquefaction
- Susceptibility to vibriostatic compound O/129

افتراق ویبریو کلرا از آئرومونـاس و پلزیومونـاس

Test	Vibrio cholerae	Aeromonas hydrophila	Plesiomonas shigelloides
KIA	Alk/Acid	Alk/Acid or Acid/Acid	Alk/Acid or Acid/Acid
TSI	Acid/Acid	Alk/Acid or Acid/Acid	Alk/Acid or Acid/Acid
H_2S	-	-	-
Gas from glucose	–	+	–
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
String	+	–	–
Motility	+	+	+
Indole	+	+	+
Esculin hydrolysis	–	+	–
DNase, 25°C	+	+	–
Lysine decarboxylase	+	V	+
Arginine dehydrolase	–	+	+
Ornithine decarboxylase	+	–	+
Gelathin liquefaction, 22°C	+	+	–
ONPG	+	+	+
VP	V	V	–
Resistance to O/129 150 µg	-	+	-
Growth in 0% NaCl	+	+	+
Growth in 1% NaCl	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	–	–
Carbohydrate			
Lactose	–	V	V
Sucrose	+	+	-
Mannitol	+	+	-
Inositol	–	-	+

String Test

- آزمایش ساده و سریع برای افتراق *ویبریو کلرا* از *آئرومونـاس* و *پلزیومونـاس*
- برای انجام آزمون رشته از محلول آبی نیم گرم درصد دزکسی کولات سدیم استفاده می شود.
  - (0.5% aqueous solution of sodium deoxycholate)

- **روش انجام آزمایش:**

۱. یک قطره معرف فوق را روی لام شیشه ای قرار دهید.
۲. بوسیله لوپ از کشت خالص و تازه (۲۴-۱۸ ساعته) باکتری مورد آزمون از روی محیط غیر انتخابی مانند بلاد آگار برداشته، در این قطره سوسپانسیون نمایید.
۳. لوپ را به آرامی از سوسپانسیون به بیرون بکشید.

String Test

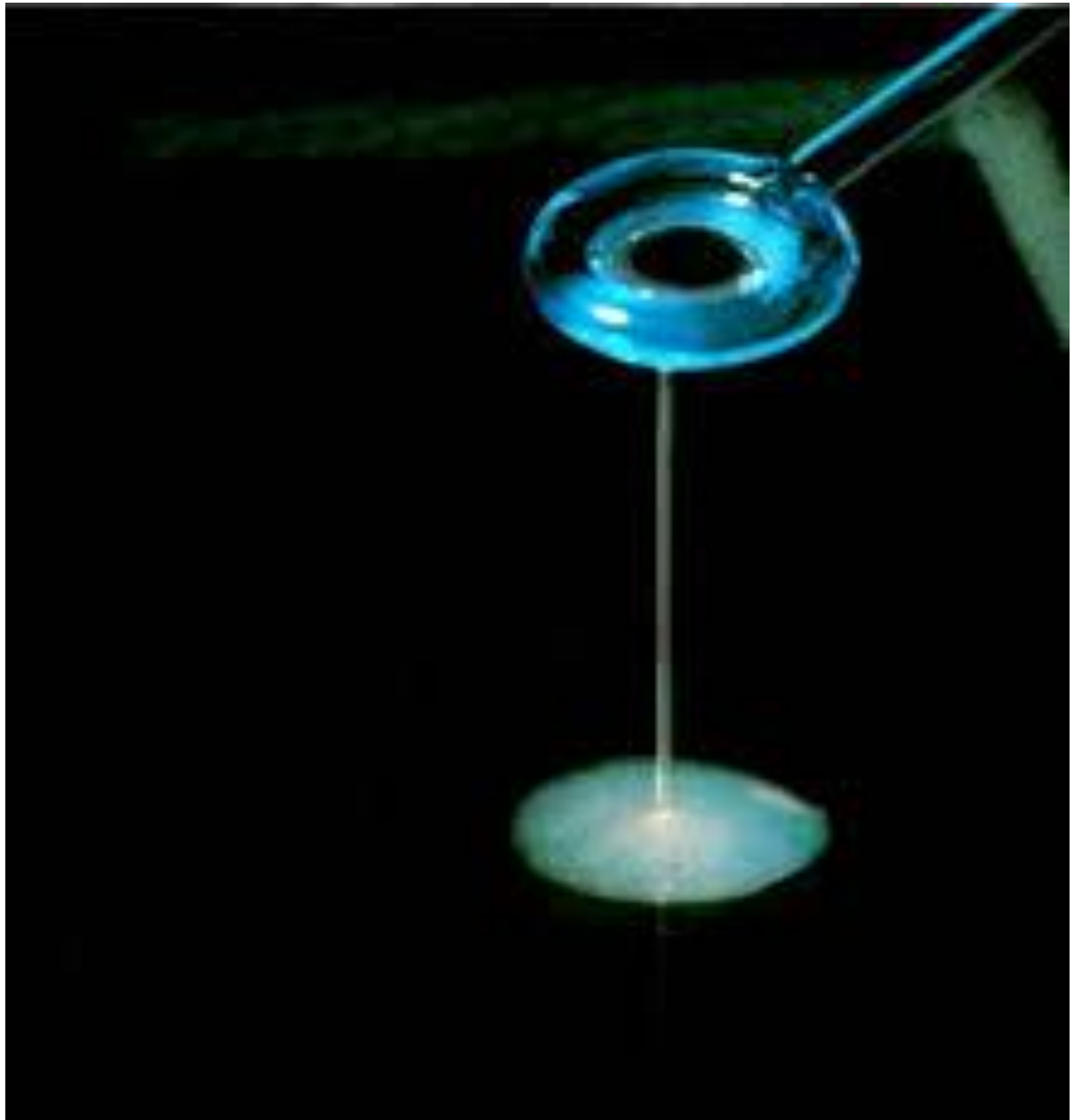
- **تفسیر:**

- *ویبریو کلرا* رشته موکوئیدی طویلی ایجاد می کند، که بعد از ۶۰ ثانیه چسبنده تر می شود.
  - سلول های باکتری بوسیله دزوکسی کولات سدیم لیز می شوند، سوسپانسیون کدورتش را از دست داده، DNA سلول آزاد، و موجب لزج شدن سوسپانسیون می شود.

- سایر *ویبریوها* ممکن است واکنش رشته اولیه ایجاد کنند، که بعد از ۴۵ تا ۶۰ ثانیه کاهش یافته یا از بین می رود.

- سویه های *آئروموناس و پلزیوموناس* معمولا منفی هستند.

String Test



V. cholerae



Table IV-2. Differential characteristics of selected members of *Vibrionaceae* and *Enterobacteriaceae*.

TEST	ORGANISM						
	Vibrio cholerae	*Vibrio mimicus*	*Halophilic vibrios*	*Aeromonas hydrophila*	*Aeromonas veronii*	*Plesiomonas shigelloides*	*Enterobacteriaceae*
KIA	K/A	K/A	V	V	K/AG	K/A	V
TSI	A/A	K/A	V	V	A/AG	K/A	V
String	+	+	+[a]	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	-
Gas from glucose	-	-	-[b]	+	+	-	V
Sucrose	+	-	V	V	+	-	V
Lysine	+	+	V	V	+	+	V
Arginine	-	-	V	+	-	+	V
Ornithine	+	+	V	-	+	+	V
VP	V	-	V	V	+	-	V
Growth in 0% NaCl[c]	+	+	-	+	+	+	+
Growth in 1% NaCl[c]	+	+	+	+	+	+	+

Note: V=variable reaction
[a] *V. parahaemolyticus*, *V. cincinnatiensis*, and *V. damsel* give variable reactions.
[b] *V. furnissii* and *V. damsel* are variable for gas from glucose.
[c] Nutrient broth base (Difco Laboratories, Detroit, MI)

Halophilic *Vibrios*: *V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. vulnificus*

Salt broths

- توانایی رشد میکروارگانیسم در حضور مقادیر مختلف کلرید سدیم (NaCl):
  - 0%
  - 1%
  - 6/5%
- افتراق *ویبریو کلرا*، *آئرومونـاس* و *پلزیومونـاس* از یکدیگر

Growth in 1% peptone in	*V. cholerae*	*Aeromonas*	*Plesiomonas*
0% NaCl	+ (& *V. mimicus*)	+	+
6/5% NaCl	+	-	-

- افتراق گونه های مهم کلینیکی *ویبریو* از یکدیگر

TABLE 20-2 Salient Features for the Identification of *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas*

	Vibrio	*Aeromonas*	*Plesiomonas*
Gram-stain reaction	–	–	–
Oxidase activity	+	+	+
Resistance to 0/129*			
10 µg	+/–	+	+/–
150 µg	–	+	–
Growth in nutrient broth with:			
0% NaCl	–/+	+	+
6.5% NaCl	+	–	–
Acid from:			
Glucose	+	+	+
Inositol	–	–	+
Mannitol	+	+/–	–
Sucrose	+/–	+/–	–
Gelatin liquefaction	+	+	–

Carnahan AM: Update on *Aeromonas* identification, *Clin Microbiol Newsl* 13:169, 1991.

+, Most strains positive; –, most strains negative; +/– or –/+, predominant reaction first.

*Vibriostatic agent (2, 4-diamino-6, 7-diisopropylpteridine).

کاربرد تست رشد در حضور نمک در افتراق گونه های مهم کلینیکی ویبریو از یکدیگر

Key Differential Tests to Divide the 12 Clinically Significant *Grimontia, Photobacterium*, and *Vibrio* species Into 6 Groups

	Reactions of the Species in:											
	Group 1		Group 2	Group 3	Group 4	Group 5			Group 6			
Test	*V. cholera*	*V. mimicus*	*V. metschnikovii*	*V. cincinna-tiensis*	*G. hollisae*	*P. damsela*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V. alginolyticus*	*V. parahae-molyticus*	*V. vulnificus*	*V. carchariae*
Growth in Nutrient Broth With												
No NaCl	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate →nitrite	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
myo-Inositol fermentation	–	–	V	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Arginine dihydrolase	–	–	V	–	–	+	+	+	–	–	–	–
Lysine decarboxylase	+	+	V	V	–	V	–	–	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	–	–	–	–	–	–	V	+	V	–

All data are for reactions within 2 days at 35°C–37°C: +, most strains (generally 90%–100%) are positive; –, most strains are negative (generally 0%–10% positive); V, between 11% and 89% are positive. Key test results are shaded.

Data from reference 215.

Salt broths

- **محیط کشت مورد استفاده:**
  - Nutrient Broth or Agar
  - Brain Heart Infusion Broth or Agar
  - Tryptic Soy Broth or Agar
- توجه ۱: استفاده از محیط دارای آگار بصورت شیبدار در لوله ارجحیت دارد. در محیط آگاردار می توان رشد یا عدم رشد باکتری را به آسانی بررسی و مشاهده نمود.
- توجه ۲: محیط های فوق دارای 0/5 درصد نمک هستند. برای تهیه محیط حاوی 6/5 درصد نمک، قبل از اتوکلاو کردن محیط، باید 6 درصد نمک به محیط پایه اضافه شود.

Salt broths

- **روش انجام آزمایش:**

۱. محیط کشت را با مقدار خیلی کم از کشت خالص و تازه (۲۴-۱۸ ساعته) باکتری مورد نظر تلقیح نمایید.

  - توجه: اگر از محیط براث استفاده می نمایید، تلقیح باید به اندازه ای کم باشد، که از کدورت قابل مشاهده قبل از انکوباسیون براث جلوگیری شود.

۲. محیط را در ۳۷-۳۵ °C به مدت ۲۴-۱۸ ساعت نکوبه نمایید.

۳. وجود رشد را بررسی نمایید. در صورت عدم رشد، محیط را تا ۷ روز انکوبه و نتیجه راروزانه بررسی نمایید.

- **تفسیر:**

  - نتیجه مثبت: رشد قابل مشاهده روی سطح شیبدار محیط (در محیط آگاردار) یا کدورت قابل مشاهده (در محیط براث)
  - نتیجه منفی: عدم رشد روی سطح شیبدار (در محیط آگاردار) یا عدم کدورت (در محیط براث)

Esculin hydrolysis

- توانایی ارگانیسم در تجزیه اسکولین به گلوکز و اسکولتین. اسکولتین با املاح آهن موجود در محیط کشت واکنش نشان داده و یک کمپلکس آهن فنولیک به رنگ قهوه ای تیره یا سیاه ایجاد می نماید.
- برای افتراق *آئرومونـاس هیدروفیلا* از *ویبریو کلرا* و *پلزیومونـاس* شیگلوئیدس

	V. cholerae	*A. hydrophila*	*P. shigelloides*
Esculin hydrolysis	-	+	-

- افتراق گونه های *آئرومونـاس* از یکدیگر

Oxidase-Positive, Fermentative, Gram-Negative Bacilli: Differential Characteristics of *Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides, Chromobacterium violaceum*, and *Vibrio cholerae*

Characteristics	*A. hydrophila*	*P. shigelloides*	*C. violaceum*	*V. cholerae*
Kligler's iron agar (slant/deep/ hydrogen sulfide)	K/A/–	K – A/A/–	K/A/–	K/A/–
Catalase	+	+	+	+
Esculin	+	–	–	–
Motility	+	+	+	+
ONPG	+	+	–	+
Indole	+	+	–	+
Voges–Proskauer	(+)	–	–	(–)
Lysine decarboxylase	+	+	–	+
Ornithine decarboxylase	–	+	–	+
Carbohydrates:				
Lactose	(–)	(+)	–	–
Sucrose	+	–	(–)	+
Mannitol	+	–	–	+
Inositol	–	+	–	–
Growth in 1% peptone with:				
0% NaCl	+	+	+	+
7% NaCl	–	–	–	–
11% NaCl	–	–	–	–

+, 90% or more of strains are positive; (+), 51%–89% of strains are positive; (–), 51%–89% of strains are negative; –, 90% or more of strains are negative; V, variable; K/A, alkaline slant/acid deep; K – A/A, alkaline to acid slant/acid deep; ONPG, *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

Differentiation of *Plesiomonas shigelloides* and Clinically Important *Aeromonas* species

Organism	Hemolysis Sheep Blood	Oxidase	Motility	DNase	Indole	Voges–Proskauer	Decarboxylase: Lysine	Decarboxylase: Ornithine	Decarboxylase: Arginine	Esculin	Gas From Glucose	Fermentation: L-Arabinose	Fermentation: Sucrose	Fermentation: Mannitol	Fermentation: Inositol
A. hydrophila complex	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–
A. caviae complex															
A. caviae	–	+	+	+	+	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–
A. media	NA	+	–	+	V	–	–	–	+	+	–	+	–	NA	NA
A. eucrenophila	NA	+	+	+	NA	–	–	–	+	+	+	V	V	+	–
A. sobria complex															
A. sobria	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	V	+	+	–
A. veronii biotype *sobria*	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	V	–	+	+	–
A. veronii biotype *veronii*	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	–
A. jandaei	+	+	+	NA	+	+	+	–	+	–	+	–	–	+	–
A. schubertii	V	+	+	+	–	V	+	–	+	–	–	–	–	–	–
A. enteropelogenes	+	+	+	NA	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+	–
P. shigelloides	–	+	+	–	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	+

+, 90% or more of strains are positive; –, 90% or more of strains are negative; V, 11%–89% of strains are positive; NA, results not available. Shaded areas indicate key reactions.
Data from references 3, 13, 18, 47, 61, 170, 171, 196, and 375.

Esculin hydrolysis

- **محیط مورد استفاده:**
  - Esculin Agar یا Bile Esculin Agar
  - تهیه شده در پلیت، یا در لوله به صورت شیبدار
- **روش انجام آزمایش:**

۱. دو یا سه کلنی خالص و تازه از ارگانیسم مورد آزمایش را در محیط کشت بایل اسکولین تلقیح کنید.
   - اگر محیط کشت در لوله تهیه شده باشد، تلقیح باید در سطح و عمق محیط انجام شده و درپیچ لوله به صورت شل بسته شود.
۲. محیط تلقیح شده را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ °C ۳۵-۳۷ انکوبه نمائید.
۳. تغییر رنگ محیط کشت را بررسی نمایید.

Esculin hydrolysis

- **تفسیر:**
  - نتیجه مثبت: تغییر رنگ به قهوه ای تا سیاه درمحیط
  - نتیجه منفی: عدم ظهور رنگ قهوه ای تا سیاه در محیط
    - توجه: در مواردی که ارگانیسم در محیط کشت رشد نموده، ولی تغییر رنگی در محیط ظاهر نشده است، نتیجه منفی در نظر گرفته می شود. این موضوع تنها بیانگر اینست که غلظت بایل رشد میکروارگانیسم را مهار نکرده است.

Bile Esculin Agar



V. cholerae

A. hydrophila



فهرست سویه های کنترل کیفی مورد نیاز

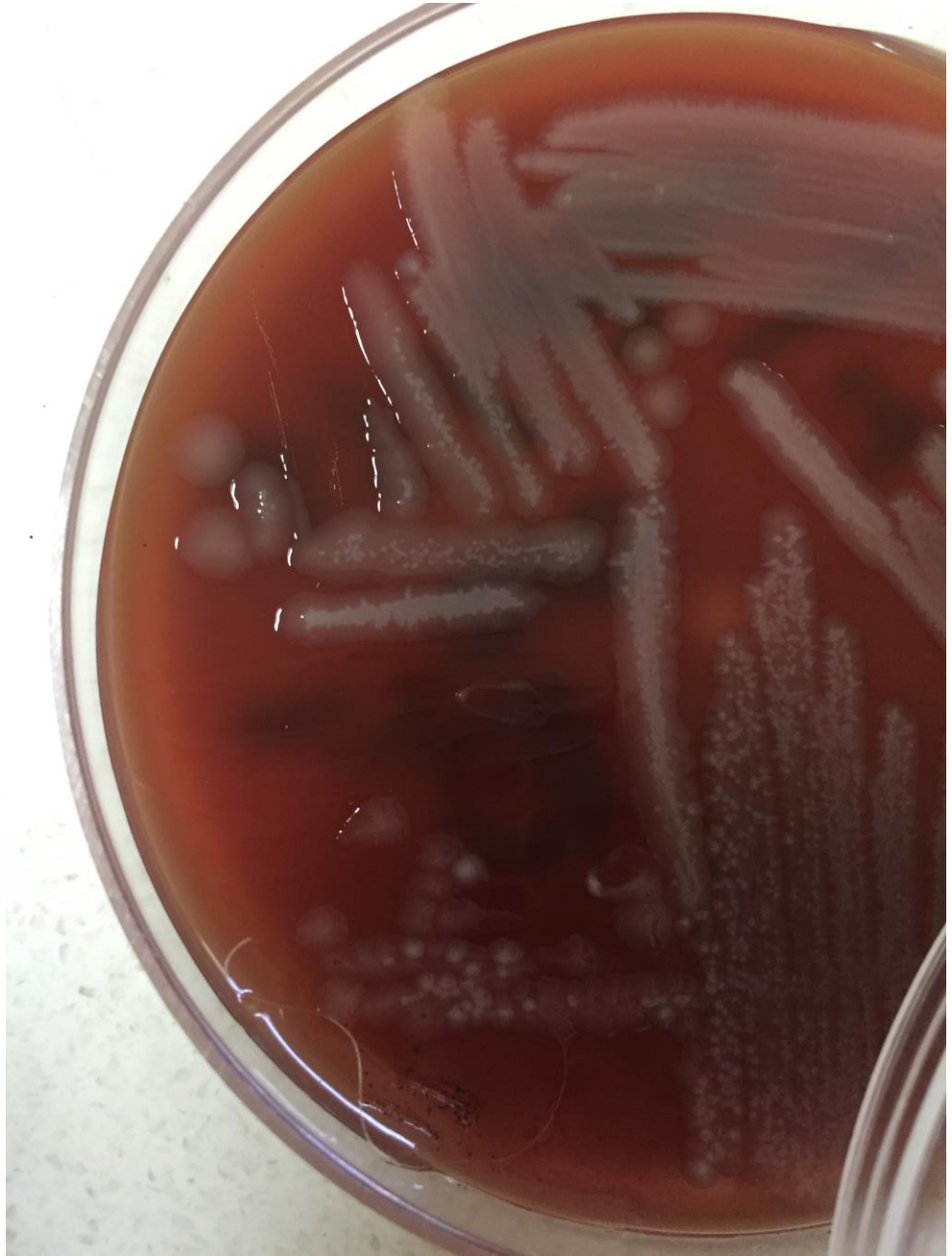
نام سویه	منبع تهیه سویه	مشخصه سویه (لیبل)	طبقه/شماره فریزر	شماره کرایورک	شماره ردیف در کرایورک	تعداد موجود	تاریخ ذخیره سازی
Escherichia coli ATCC 25922							
Staphylococcus aureus ATCC 25923							
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853							
Enterococcus faecalis ATCC 29212							
Salmonella Typhimurium ATCC 14028							
Shigella flexneri ATCC 12022							
Proteus mirabilis ATCC 43071							
Klebsiella pneumoniae ATCC 13188							
Vibrio parahaemolyticus							
Vibrio cholerae NON-O1							
Streptococcus agalactiae ATCC 12386							
Streptococcus pyogenes ATCC 19615							
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305							
Enterobacter aerogenes ATCC 13048							
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883							

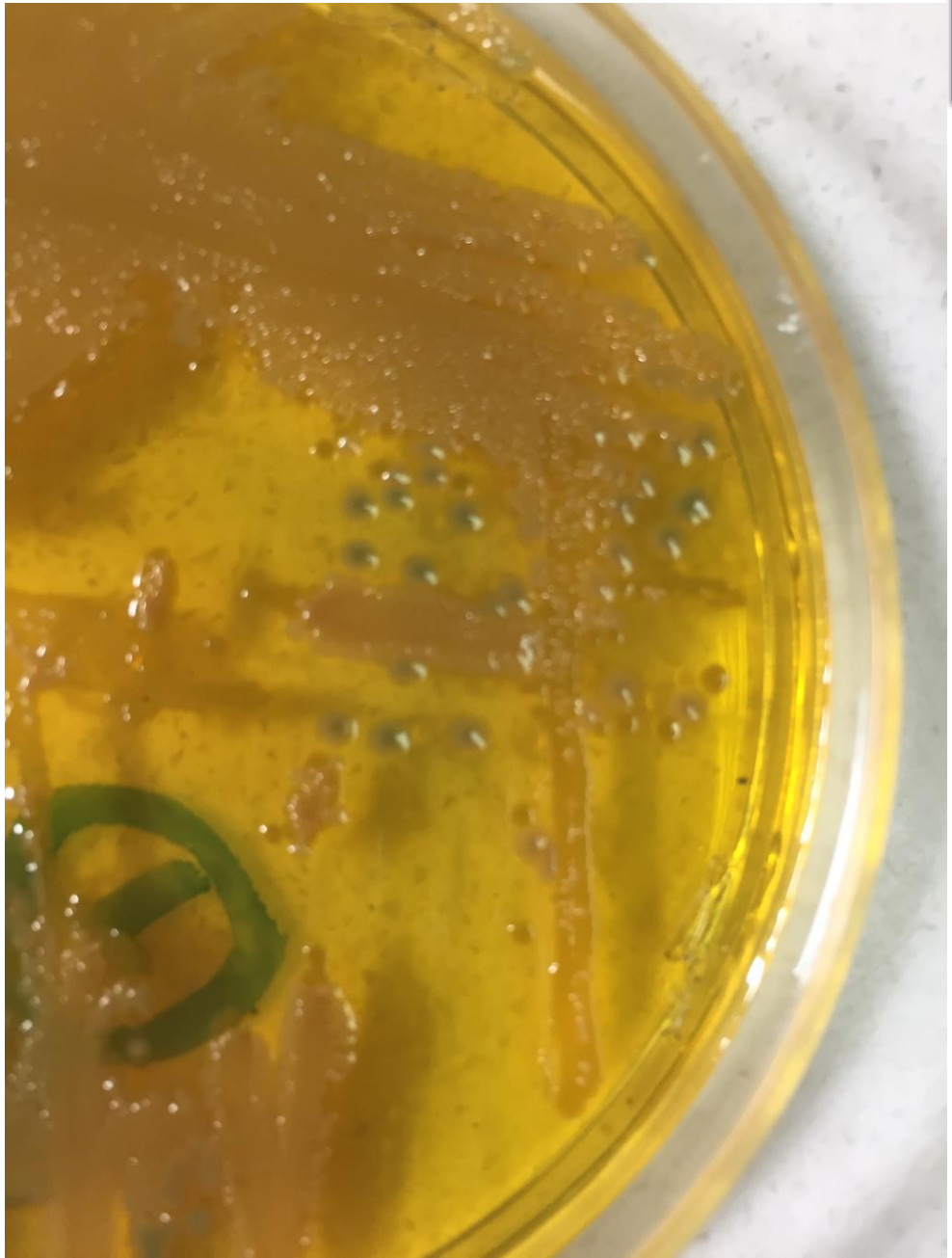
ارجاع نمونه ها برای تایید تشخیص

- ارجاع از آزمایشگاه های مراکز بهداشت محیطی به آزمایشگاه سطح بالاتر (استان/دانشگاه)
- ارجاع از آزمایشگاه استان/دانشگاه به آزمایشگاه مرجع سلامت برای:
  - تایید تشخیص
  - آزمایش تعیین حساسیت ضد میکروبی و پایش آن
  - آزمایش های مولکولی برای بررسی های اپیدمیولوژی
- **شرایط ارسال ایزوله ها:**
  - کشت خالص و تازه سویه
  - بر روی محیط KIA یا TSA (Tryptic Soy Agar) در لوله شیب دار با در محکم
  - فرم شماره ۳ (اطلاعات بیمار و آزمایش ها)
  - نامه رسمی در اتوماسیون
  - هماهنگی قبلی با آزمایشگاه مرجع سلامت
  - بسته بندی استاندارد سه لایه جهت حمل امن و ایمن نمونه


محیط فاقد
کلنی و آبدار

کلنی های مخلوط روی محیط های TCBS و BA





مثال هایی از
مواد مورد استفاده در بسته بندی
سه لایه استاندارد

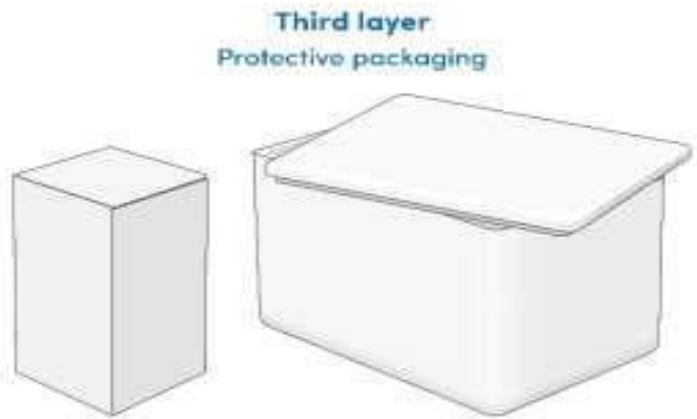
ظرف اولیه:
ضدآب و غیرقابل نشت، مانند لوله آزمایش یا ظرف نمونه مدفوع
به همراه ماده جاذب

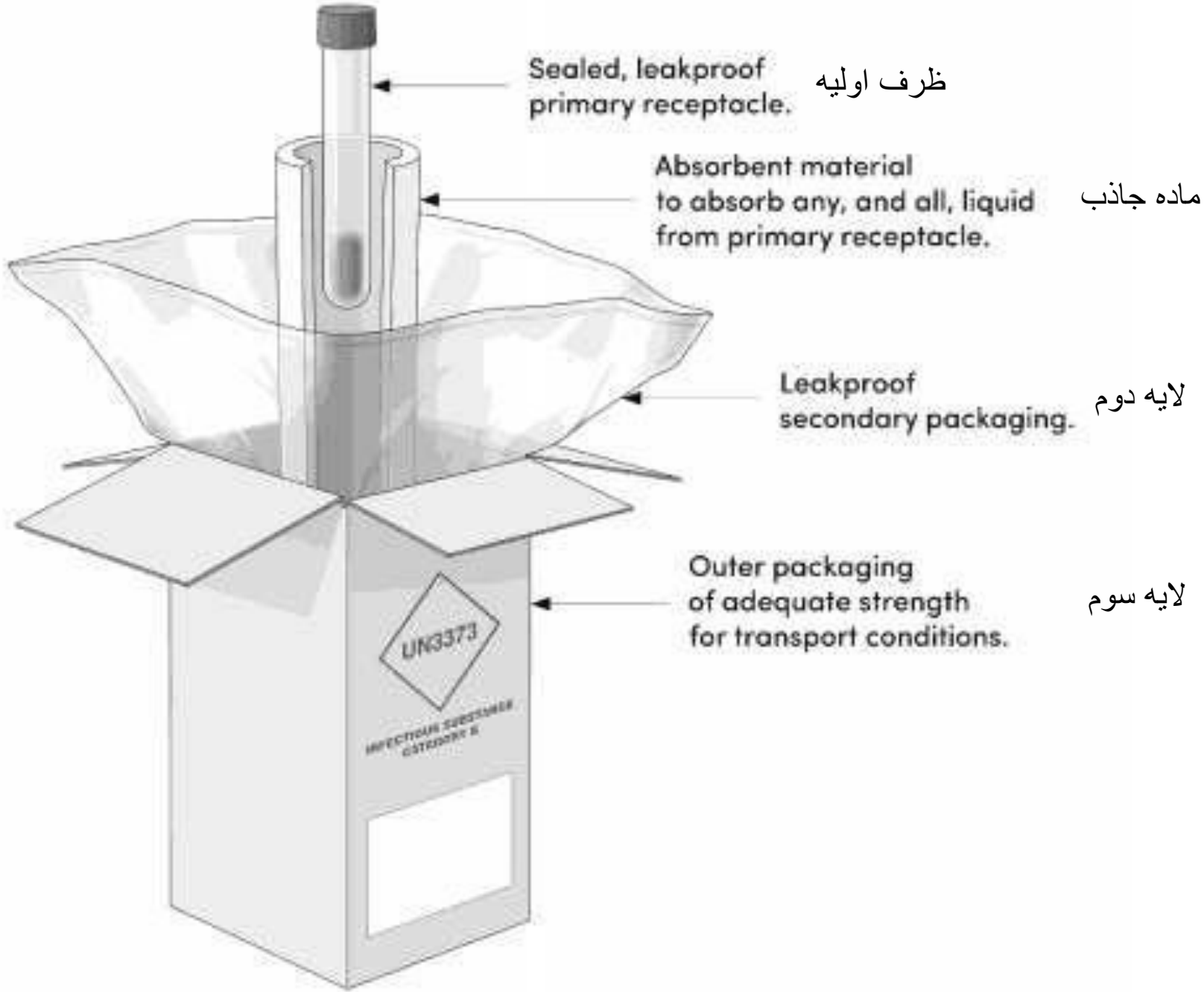


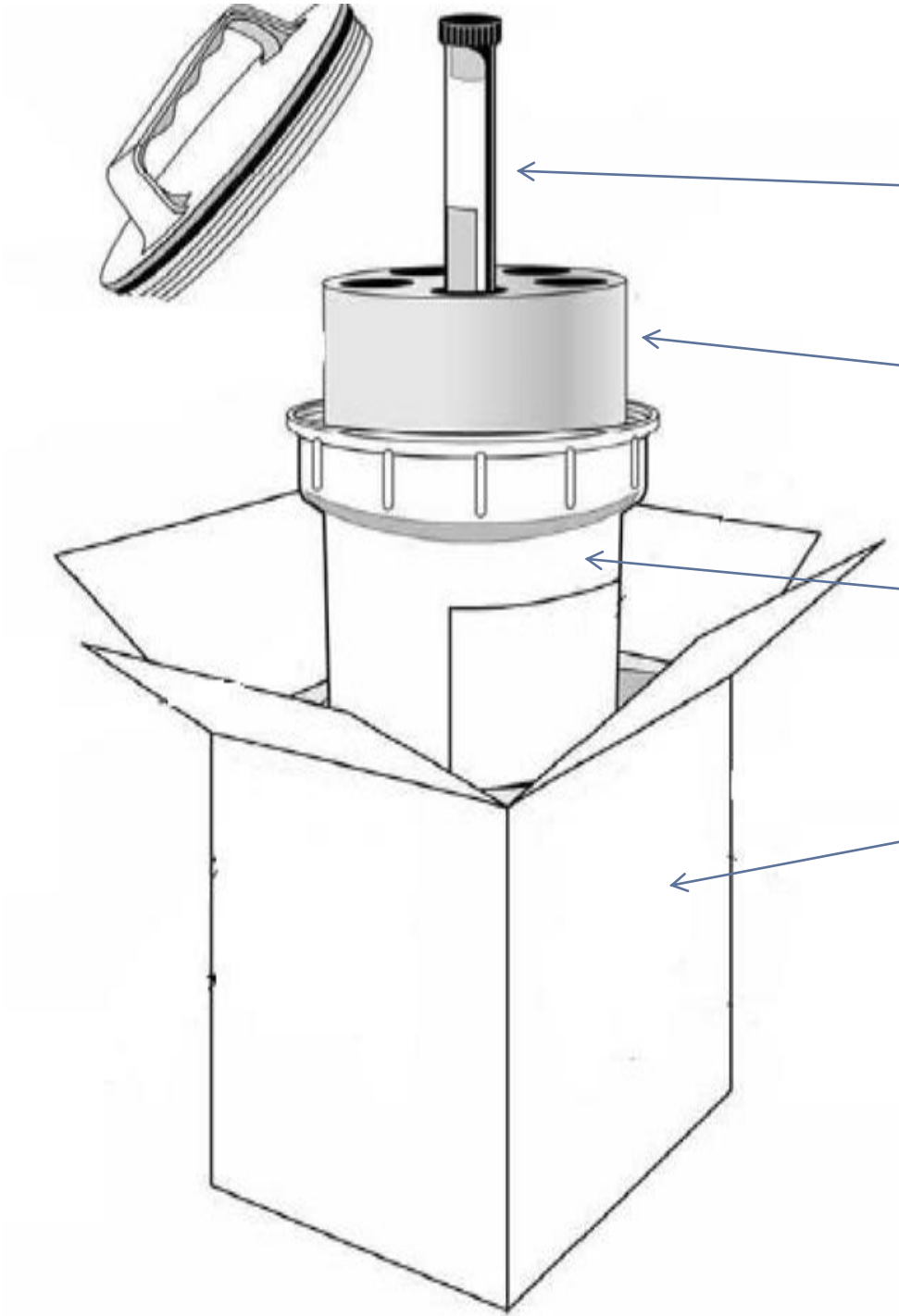
لایه دوم:
ضدآب و غیرقابل نشت، برای محافظت از ظرف اولیه و ماده جاذب
مانند زیپ کیپ یا قوطی درپیچ دار پلاستیکی محکم



لایه سوم:
برای محافظت از لایه دوم
مانند جعبه های کاغذی محکم متناسب با وزن و اندازه بسته های داخلی




Sealed, leakproof
primary receptacle.
ظرف اولیه
Absorbent material
to absorb any, and all, liquid
from primary receptacle.
ماده جاذب
Leakproof
secondary packaging.
لایه دوم
Outer packaging
of adequate strength
for transport conditions.
لایه سوم
UN3373



ظرف
اولیه

ماده جاذب و
ضربه گیر

لایه دوم

لایه سوم
(بیرونی)




BIOHAZARD



برنامه مهارت آزمایی سال ۱۴۰۰

نتایج ارزیابی پاسخ آزمایشگاه ها در بین ۱۱۳ آزمایشگاه شرکت کننده در برنامه مهارت آزمایی سال ۱۴۰۰، به تفکیک هر یک از سویه های مجهول:

کد نمونه	پاسخ مورد انتظار (گزارش به واحد بیماری ها/پزشک)	تعداد (درصد) پاسخ های صحیح گزارش شده	تعداد (درصد) پاسخ های نیمه صحیح گزارش شده	تعداد (درصد) پاسخ های نادرست گزارش شده
1400-1-B1	Vibrio cholerae Non-O1 serogroup isolated.	74 (65.5%)	17 (15%)	22 (19.5%)
1400-1-B2	Plesiomonas shigelloides isolated.	69 (61.1%)	10 (8.8%)	34 (30.1%)
1400-1-B3	Salmonella serogroup D non Typhi isolated.	56 (49.5%)	47 (41.6%)	10 (8.9%)
1400-1-B4	No Salmonella spp., Shigella spp. & Vibrio cholerae isolated.	44 (39%)	5 (4.4%)	64 (56.6%)