



دانشگاه اصفهان

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

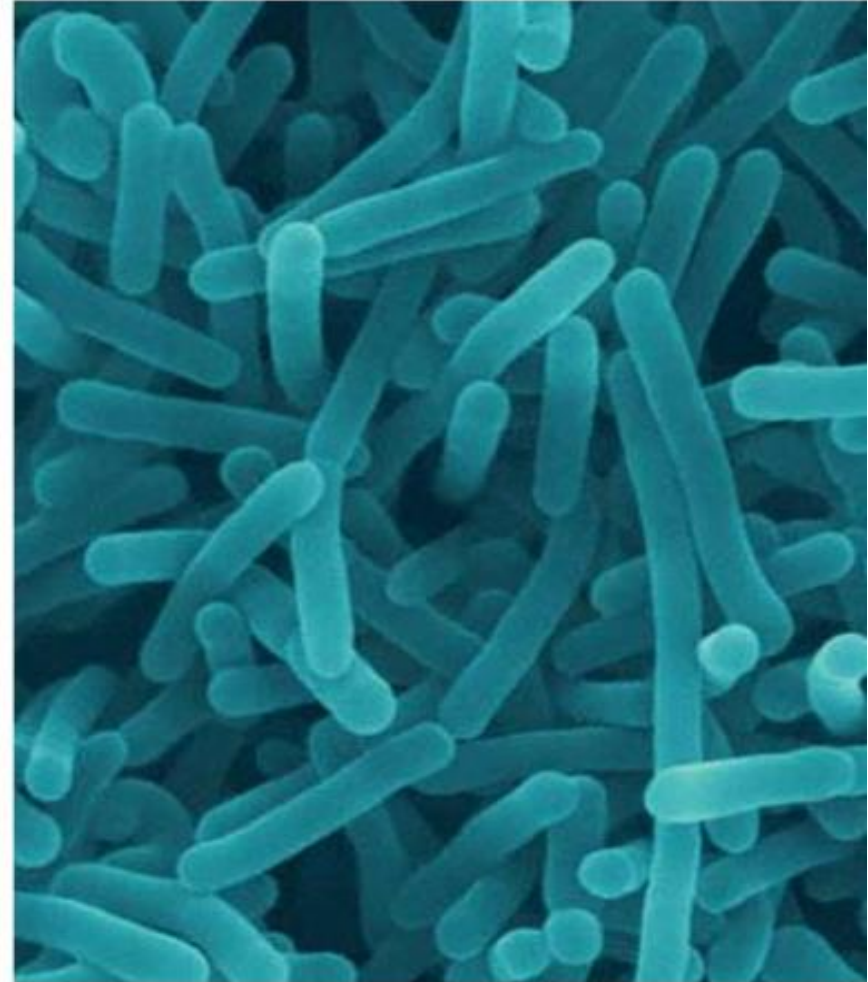


آزمایشگاه باکتری شناسی ۱

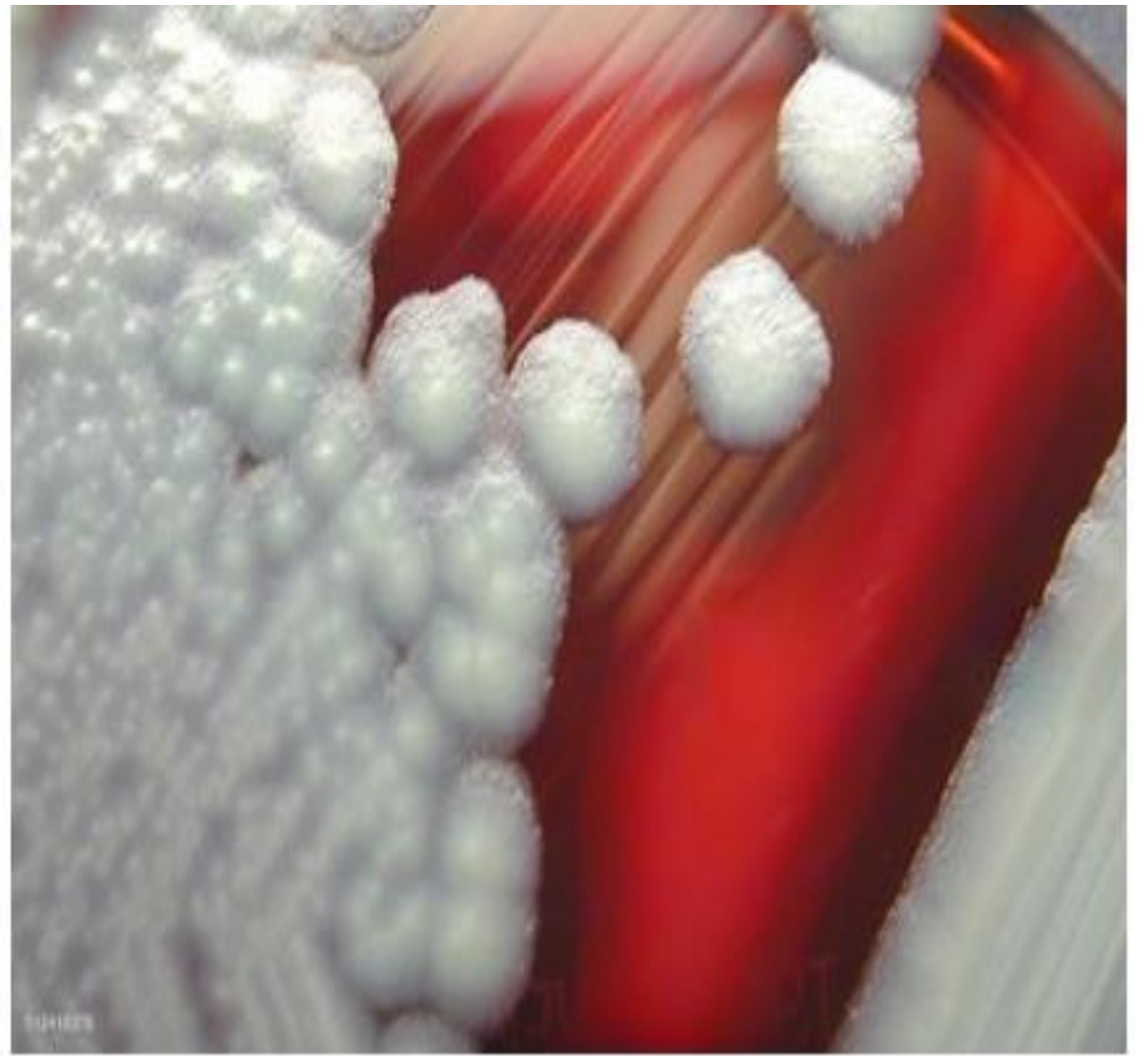
**انجام بررسی اسلایدهای میکروسکوپی و پلیت های مربوط به باسیل
های گرم مثبت اسپوردار، آشنایی با محیط های اختصاصی جهت
شناسایی باسیل های گرم مثبت**

Medically Important GPR

- Bacillus
- Clostridium
- Listeria
- Erysipelothrix
- Lactobacillus
- Actinobacteria
 - Streptomyces
 - Proprionibacterineae
 - Corynebacterium
 - Nocardia
 - Mycobacterium



باسیل‌های گرم مثبت تولیدکننده اسپور عبارتند از گونه‌های کلستریدیوم و باسیلوس. این باسیل‌ها در همه جا پراکنده بوده و از آنجایی که اسپور تولید می‌کنند، می‌توانند سال‌ها در محیط زنده باقی بمانند. گونه‌های باسیلوس هوازی هستند در حالی که کلستریدیوم‌ها بی‌هوازی اجباری می‌باشند.



کلی‌های بتا همولیتیک باسیلوس سرئوس بر روی محیط خوندار

باسیلوس‌ها

در این جنس تعداد زیادی باسیل‌های درشت، گرم مثبت، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت و متحرک قرار دارند که در طبیعت به فراوانی یافت می‌شوند. باسیلوس‌ها اهمیت زیادی از لحاظ پزشکی و اقتصادی دارند. بسیاری از گونه‌ها استفاده صنعتی دارند و برای تولید آنتی‌بیوتیک (پلی‌میکسین B و باسیتراسین) الکل، ویتامین‌ها، حلال‌ها و آنزیم‌ها استفاده می‌شوند.

باسیلوس آنتراسیس (*Bacillus anthracis*)

باسیلوس آنتراسیس باسیل گرم مثبت با ۱ میکرومتر قطر و ۴ تا ۱۰ میکرومتر طول است که انتهای باسیل‌ها چهارگوش بوده و به صورت واگن‌های قطار، پشت سر هم قرار می‌گیرند و بدون حرکت است (شکل ۱). کپسول آن برخلاف سایر باکتری‌ها از جنس پروتئین (D گلوتامیک) است و به همراه اگزوتوکسین در پاتوژنز باکتری نقش دارد. اسپور این باکتری حدود یک میکرومتر طول دارد و می‌تواند برای مدت‌های طولانی در طبیعت باقی بماند. اسپور در محیط‌های کشت معمولی آزمایشگاه در ۳۷ درجه سانتیگراد به راحتی تبدیل به فرم رویشی شده و به صورت کلافی درهم‌پیچیده درمی‌آید. اسپور باکتری در دمای ۱۱۵ درجه سانتیگراد در مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال می‌شود، ولی قادر است سال‌ها (حتی تا ۲۰ سال) در خاک و فرآورده‌های دامی زنده بماند که این ویژگی عامل مهمی در انتشار بیماری به حساب می‌آید. سیاه‌زخم یکی از جدی‌ترین بیماری‌هایی است که می‌تواند تعداد زیادی کشته در یک شهر یا منطقه بر جای بگذارد. دوز کشنده تنفسی اسپور حدود یک بیلیونیم گرم است. از سوی دیگر، دانشمندان با دستکاری در ژن این میکروب قادرند گونه‌های مقاوم در برابر واکسن‌ها و درمان‌های موجود را تولید نمایند.



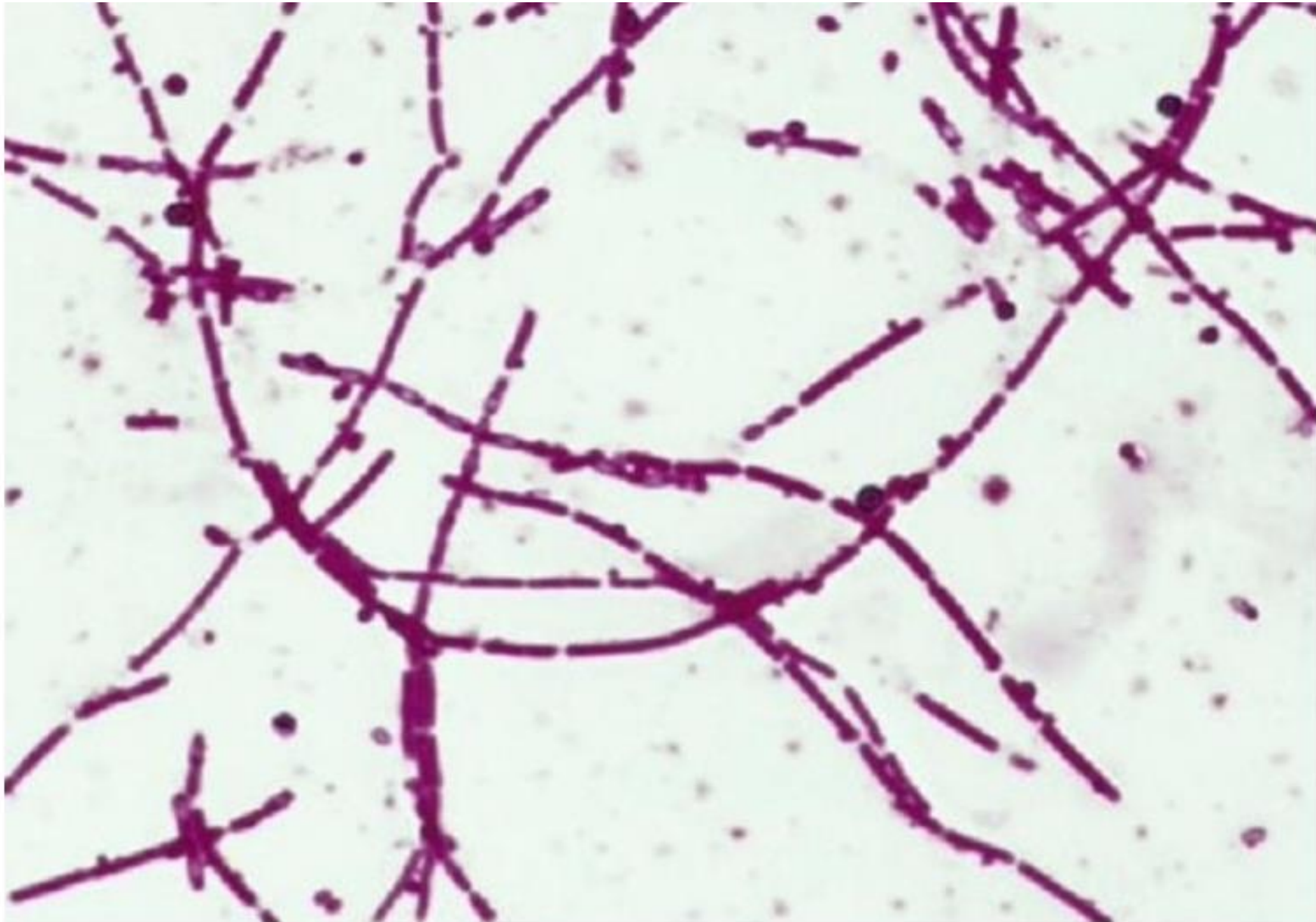
کلنی های باسیلوس آنتراسیس بر روی محیط ژلوز خوندار

Selective medium:(PLET medium)

- Consisting of heart infusion agar with polymyxin, lysozyme, ethylene diamine tetracetic acid and thallos acetate.
- It is used for the isolation of *B. anthracis*.



PLET MEDIUM showing growth of Anthrax bacilli



شکل (۱): نمای باسیل‌های چهارگوش پشت سرهم باسیلوس آنتراسپیس

Blood agar media:

- The colonies are non haemolytic, occasional strains produce a narrow zone of haemolysis.

Gelatin stab culture:

- Gelatin is liquefied mostly at the top due to aerobic environment and gives a characteristic inverted fir tree appearance.

INVERTED FIR TREE APPEARANCE



این باکتری در خون، گوشت، پشم، پوست، مو، ادرار و مدفوع حیوانات مبتلا به سیاه‌زخم یافت می‌شود و باعث آلودگی چراگاه‌ها و مزارع می‌گردد و انسان به‌صورت تصادفی از طریق خراش پوستی، تماس با حیوانات آلوده، تنفس و مواد خوراکی آلوده می‌گردد. باسیلوس آنتراسیس موجب بیماری سیاه‌زخم (آنتراکس) می‌شود. این نام از کلمه یونانی anthrakis به معنی زغال گرفته شده که به خاطر رنگ سیاهی است که در زخم ناشی از بیماری ایجاد می‌شد. این بیماری عمدتاً بیماری گوسفند، بز، گوساله، اسب و چارپایان است و حیوانات دیگر (مانند موش صحرائی) به این بیماری نسبتاً مقاوم هستند. در انسان تقریباً ۹۵ درصد از موارد سیاه‌زخم را فرم پوستی (پوستول بدخیم) و ۵ درصد موارد را عفونت تنفسی بیماری پشم‌ریسان (Woolsorters' disease) تشکیل می‌دهد. سیاه‌زخم گوارشی نادر است و در بیشتر موارد از آفریقا و آسیا که گوشت آلوده را مصرف می‌کنند، گزارش شده است. در حیوانات، سیاه‌زخم گوارشی بیشتر از دو فرم دیگر بیماری است. آنتراکس مغزی (Meningeal anthrax) در حدود ۵ درصد موارد، از ادامه سه فرم دیگر آنتراکس حاصل می‌شود. باکتری توسط خون به مغز رفته و سبب مننژیت هموراژیک می‌گردد.

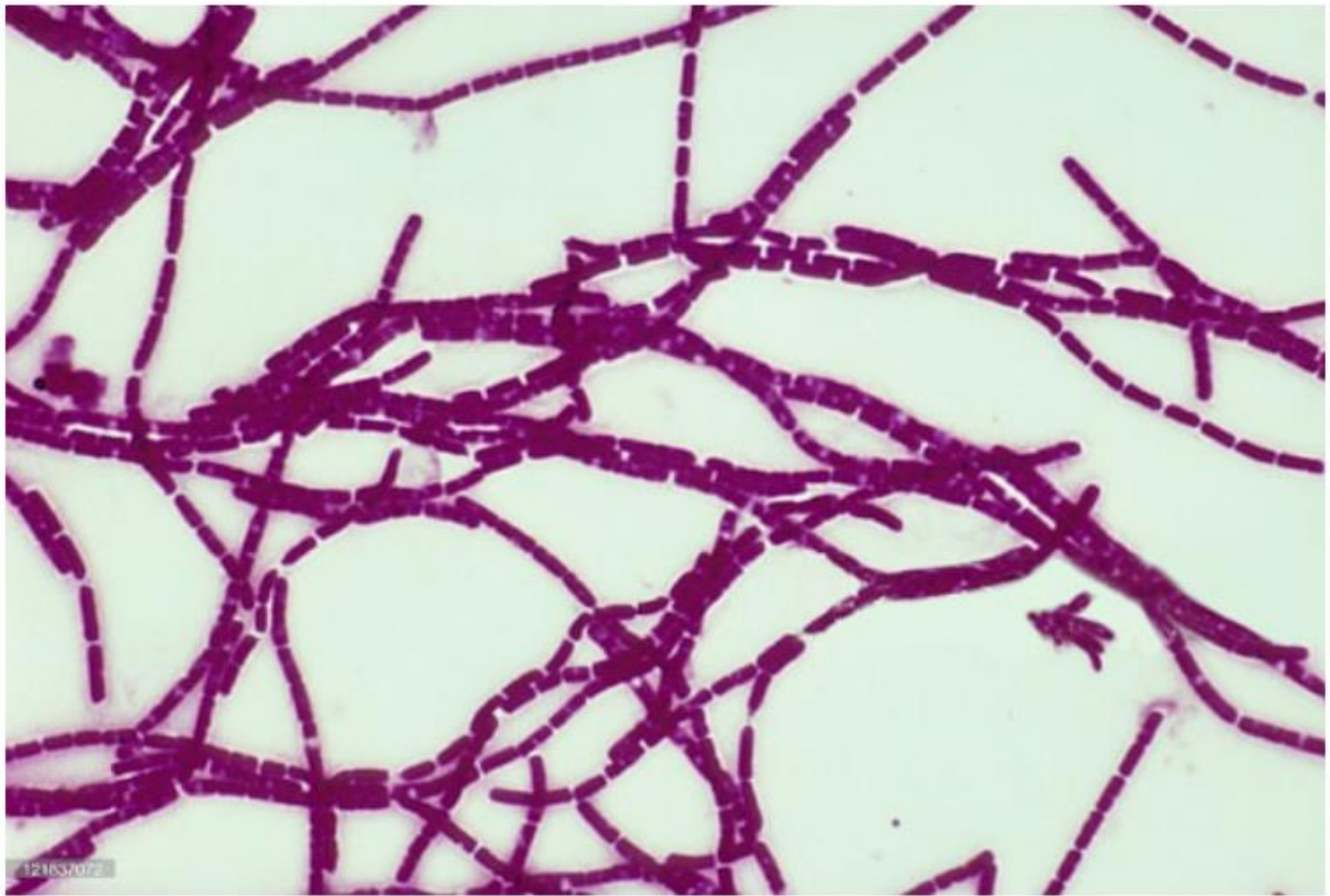
اقدامات لازم برای پیشگیری از بیماری در مناطق اندمیک عبارتند از:

سوزاندن یا دفن لاشه‌های آلوده در گودال‌های عمیق دارای آهک، ضدعفونی محصولات حیوانی (با اتوکلاو)، استفاده از دستکش و پوشاک محافظت‌کننده در افرادی که در خطر بالای ابتلا قرار دارند، ایمن‌سازی فعال دام‌ها به کمک واکسن زنده ضعیف شده و واکسینه کردن افرادی که در خطر شغلی بالایی هستند. این واکسن، از نوع بدون سلولی و حاوی آنتی‌ژن محافظت‌کننده خالص شده است.

باسیلوس سرئوس

باسیلوس سرئوس به صورت ساپروفیت در خاک، آب و هوا وجود دارد. این باکتری برخلاف باسیلوس آنتراسیس متحرك بوده و همولیزین تولید می‌کند. این باکتری در انسان سبب مسمومیت غذایی می‌شود که دو شکل مجزا دارد: نوع استفراغ‌دهنده که ناشی از مصرف برنج پخته‌شده است و نوع اسهالی که ناشی از مصرف گوشت و سس است. باسیلوس سرئوس در غذا یا روده دو انتروتوکسین تولید می‌کند. شیوه عمل یکی از انتروتوکسین‌های آن مشابه سم وبا است و ایجاد اسهال می‌کند. شیوه عمل انتروتوکسین دیگر شبیه به انتروتوکسین استافیلوکک اورئوس است که فرم استفراغی را سبب می‌شود. این فرم از انتروتوکسین مقاوم به گرما است. فرم اسهالی مسمومیت غذایی ناشی از باسیلوس سرئوس ۱۸-۱۰ ساعت پس از خوردن برنج پخته و محصولات لبنی در فرد ایجاد می‌شود و مشابه مسمومیت غذایی ناشی از کلستریدیوم پرفرنژ است.

فرم استفراغی مسمومیت غذایی ناشی از باسیلوس سرئوس ۵-۱ ساعت پس از خوردن غذاهای آلوده به سم یا اسپور در فرد ظاهر شده و علاوه بر استفراغ، تهوع نیز مشاهده می‌شود. برای این بیماری درمان آنتی‌بیوتیکی توصیه نشده و فقط درمان علامتی صورت می‌گیرد. برای پیشگیری روش خاصی وجود ندارد.



نمای میکروسکوپی باسیلوس سرنوس

تشخیص آزمایشگاهی

نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه: برای تشخیص بیماری سیاه‌زخم، از خون، CSF، چرک آبسه (پوستول)، خلط و مدفوع بیمار نمونه‌برداری می‌نمایند و برای تشخیص مسمومیت غذایی از باقیمانده مواد غذایی، مدفوع بیمار، مواد حاصل از استفراغ یا نمونه‌های دیگر (نمونه‌های چرک و خلط) استفاده می‌شود. در زخم‌های تازه می‌توان مایع را با خراشیدن ضایعه به وسیله سوزن تهیه و توسط سوآب برداشت نمود.

برای تشخیص باسیلوس‌ها از روش‌های زیر استفاده می‌شود:

آزمایش مستقیم

از نمونه‌ها دو لام تهیه کرده و بعد از خشک کردن، یک لام را رنگ‌آمیزی گرم و دیگری را که به‌طور ناقص با سه بار عبور سریع از روی شعله فیکس شده است، با رنگ گیمسا رنگ نمایید.

باسیل شاربن (سیاه‌زخم) در رنگ‌آمیزی گرم به‌صورت باسیل‌های بزرگ گرم مثبت، کپسول‌دار و بدون اسپور و مشابه واگن‌های قطار پشت سرهم قرار می‌گیرند. در رنگ‌آمیزی گیمسا به شکل باسیل‌های آبی که به‌وسیله مواد کپسولی (قرمز-ارغوانی) به‌طور نامنظم احاطه شده است، مشاهده می‌گردد.

کشت

نمونه‌ها را می‌توان مستقیماً در محیط‌های آزمایشگاهی در شرایط خاص (با رعایت شرایط ایمنی برای سیاه‌زخم) کشت داد. در مسمومیت غذایی نمونه‌های مدفوع را می‌توان با استفاده از شوک حرارتی کشت نمود، به این صورت که ابتدا نمونه را در سرم فیزیولوژی یا آب مقطر رقیق نموده و در حرارت $62/5$ درجه برای ۱۵ دقیقه (۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه) قرار می‌دهند تا کلیه باکتری‌های فعال از بین رفته و در این صورت فقط اسپورهای باقیمانده را بر روی محیط‌های مختلف کشت می‌دهند. پس از انکوباسیون در $35-37$ درجه برای مدت ۱۸-۲۴ ساعت، مشخصات کلنی را بررسی می‌نمایند.

باسیلوس‌ها، از جمله باسیل سیاه‌زخم و باسیلوس سرئوس کلنی‌های بزرگ، پهن، نامنظم با حاشیه چین‌دار به اندازه ۴-۵ mm که در اطراف کلنی رشته‌هایی (filament) کشیده و پیچیده شبیه موی مجعد (Medusa head) ایجاد می‌نمایند. کشت نمونه باکتری در مجاورت CO_2 , HCO_3^- و محیط‌های غنی، سبب ایجاد کپسول پلی‌پپتیدی (از جنس پلی‌گاما دی‌گلوتامیک اسید) می‌گردد.



Laboratory diagnosis:

- Bacillus cereus can be isolated from feces by using selective media such as:
- MYPA (mannitol, egg yolk, phenol red and agar)
- PEMBA (polymyxin B, egg yolk, mannitol, bromothymol blue, agar).
- It is motile, non-capsulated and not susceptible to gamma phage.

تست سرولوژی

امروزه آزمایش‌هایی برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های تولیدشده بر ضد توکسین‌های ادم‌دهنده و کشنده در دسترس است، اما کاربرد چندانی ندارد. در استفاده از این تست‌ها می‌بایست افزایش ۴ برابر آنتی‌بادی در عرض ۴ هفته بررسی شود. یک تست مثبت باید یا دارای افزایش ۴ برابر در تیتر و یا به تنهایی دارای تیتر بالاتر از ۱:۳۲ باشد.

افتراق باسیلوس آنتراسیس از سایر باسیلوس‌ها

باسیلوس آنتراسیس بر روی محیط بلاد آگار فاقد همولیز بوده درحالی‌که باسیلوس سرئوس و بقیه باسیلوس‌ها همولیز β ایجاد می‌نمایند. باسیلوس آنتراسیس در کمتر از ۱۴ درجه و بیشتر از ۴۴ درجه رشد نمی‌کند و در ۴۲-۴۴ قدرت بیماری‌زایی خود را از دست می‌دهد. چنانچه این باکتری را در محیط لوله حاوی ژلاتین کشت دهند، حالتی شبیه سرو وارونه (قیف) ایجاد می‌کند و در محیط آب پپتونه و آبگوشت، دانه درشت در ته لوله و پرده نازک در سطح تشکیل می‌دهد، درحالی‌که بقیه باسیلوس‌ها لوله را کدر می‌کنند. باسیل سیاه‌زخم قندها را بدون ایجاد گاز تخمیر می‌کند، نشاسته را هیدرولیز، سرم را منعقد و شیر تورنسل‌دار را منعقد و بی‌رنگ می‌کند. کاتالاز، اکسیداز و VP مثبت بوده و نیترات را به نیتريت تبدیل می‌نماید. باسیلوس آنتراسیس بر روی محیط ائوزین متیلن بلو دارای رشد ضعیف یا فاقد رشد است. تزریق نمونه مشکوک به سیاه‌زخم، به حیوان حساس (خوکچه هندی) سبب مرگ آن حیوان پس از ۲۴-۴۸ ساعت می‌گردد. باسیل سیاه‌زخم به فاژ گاما (γ) حساس بوده، درحالی‌که سایر باسیلوس‌ها مقاوم هستند. باسیلوس سرئوس مانند باسیلوس آنتراسیس لسیتیناز مثبت است. در جدول ۱ وجه تمایز باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس سرئوس نشان داده شده است.

جدول (۱): وجه تمایز باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس سرئوس

باسیلوس سرئوس	باسیلوس آنتراسیس	مشخصات
بتا	متغیر	همولیز بتا روی محیط بلاد آگار
+	+	رشد در شرایط بیهوازی
+	-	حرکت
+	+	لسیتیناز
+	+	هیدرولیز نشاسته
+	-	سالیسین
+	-	تولید بتالاکتاماز

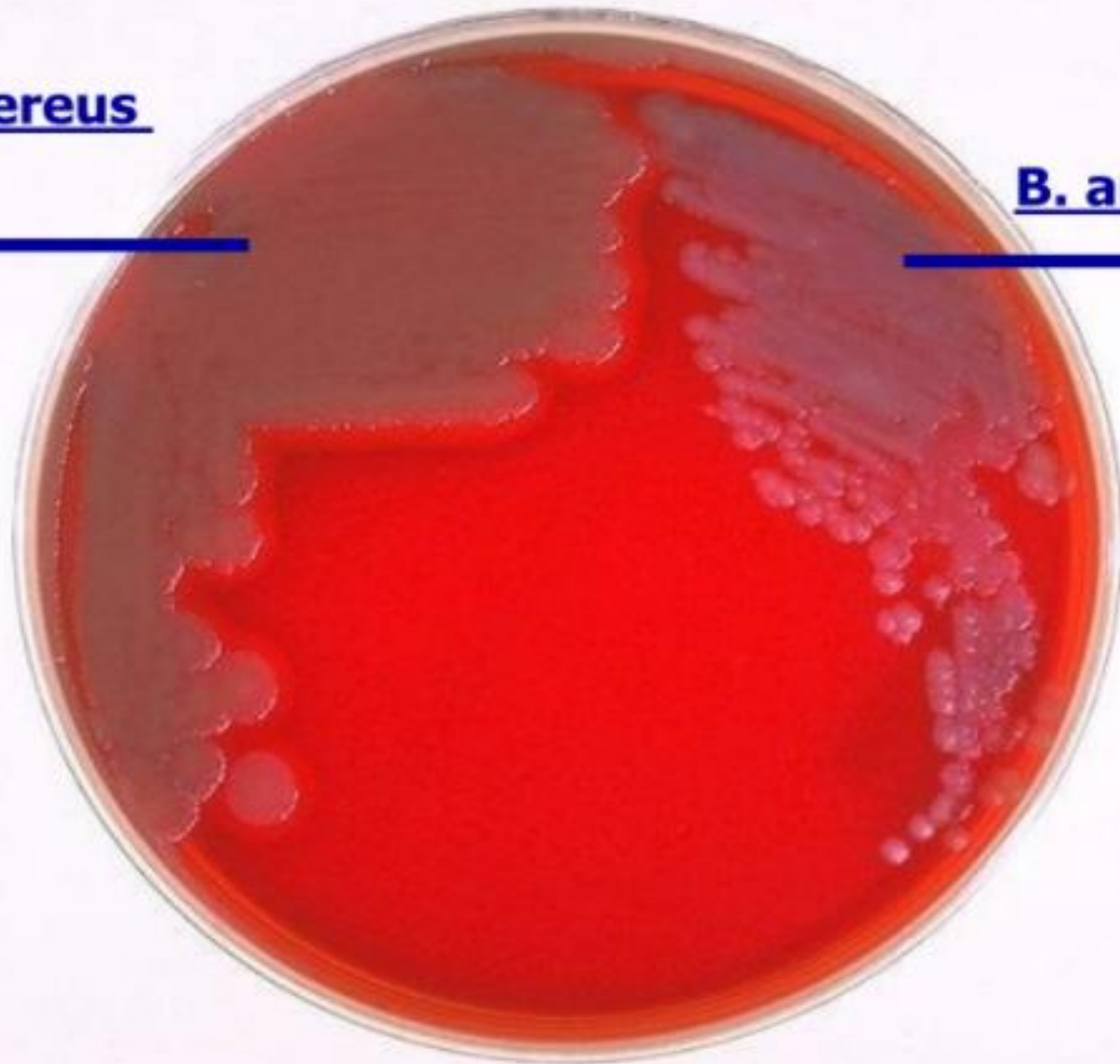
Differential characteristics of *B. anthracis* & *B. cereus*

	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>
Hemolysis	No hemolysis	β -hemolysis
Motility	Non-Motile	Motile

B. cereus



B. anthracis



تست رشته مروارید (گردن بند) (String test)

چنانچه باسیل سیاه‌زخم به صورت غلیظ بر روی محیط مولر هینتون کشت داده شده و یک دیسک ۱۰ واحدی پنی‌سیلین روی آن به مدت ۳-۶ ساعت انکوبه شود، پس از برداشت نمونه از حاشیه ناحیه عدم رشد و تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی می‌توان باکتری‌ها را به صورت رشته مروارید (گردن بند) مشاهده نمود، در حالی که بقیه باسیلوس‌ها این خصوصیت را ندارند. تشکیل رشته مروارید بدلیل حساسیت باسیل سیاه‌زخم به پنی‌سیلین است.

تست آسکولی

تست آسکولی آزمایشی حساس برای بررسی علت مرگ حیوان ناشی از باسیل سیاه‌زخم است؛ به این صورت که قطعه کوچکی از احشاء حیوان مرده در اثر بیماری سیاه‌زخم را در هاون کوبیده، سپس به آن ۵ برابر سرم فیزیولوژی اضافه نموده و آن را می‌جوشانند، پس از سرد شدن، مقدار ۵/۵ ml از آن را در یک لوله آزمایش ریخته و بر روی آن چند قطره آنتی‌بادی اختصاصی می‌ریزند. چنانچه صفحه کدری در محل برخورد آنتی‌ژن با آنتی‌بادی مشاهده شود (واکنش پرسی‌پیتاسیون) دلیل بر وجود آنتی‌ژن باسیل سیاه‌زخم است.

نکته ۱:



آنتراکس را نمی‌توان در گستره‌های خشک با تکنیک‌های رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس شناسایی نمود. در آزمایشگاه‌های کلینیکی و مرجع از کشت دادن، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی (موش و خوکچه هندی)، فازتایپینگ، الیزا و روش‌های مولکولی (PCR) در تشخیص آزمایشگاهی باسیلوس آنتراسیس استفاده می‌شود.

نکته ۲:



باسیلوس سرئوس را می‌توان در افراد دچار سوختگی، زخم پس از عمل جراحی، مننژیت، آبسه‌های مغزی، خلط و خون بدست آورد. وجود 10^5 عدد باکتری و اسپور در یک گرم غذا یا مدفوع دلیل بر آلودگی است.

نکته ۳:

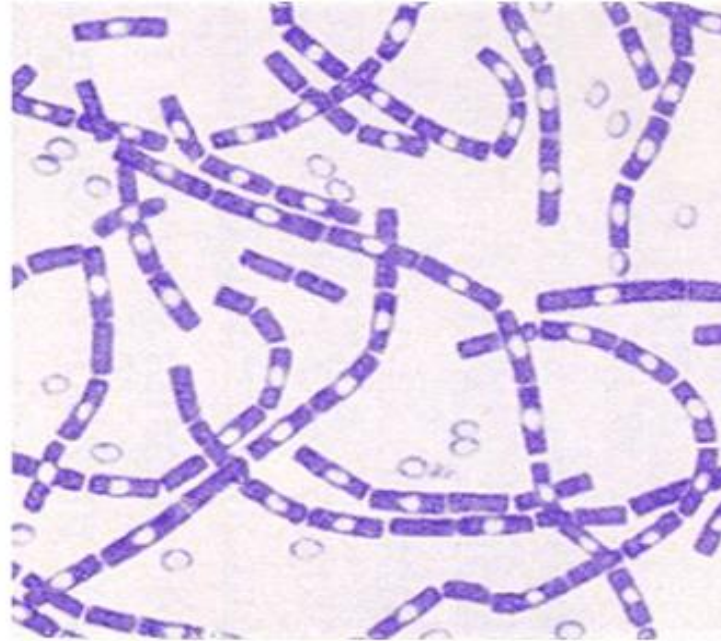


چنانچه باسیلوس‌ها در کشت کهنه گرم منفی نشان داده شود، برای تمایز اینها از باسیل‌های گرم منفی واقعی از بررسی حساسیت به دیسک وانکومايسين استفاده می‌شود که باسیلوس‌ها حساس ولی باسیل‌های گرم منفی‌ها مقاوم‌اند. همچنین اگر کلنی باسیل‌های گرم منفی را در يك قطره سود ۴۰٪ حل نماییم، ایجاد ویسکوزیته نموده و تشکیل رشته می‌دهند، درحالی‌که باسیلوس‌ها ایجاد ویسکوزیته نمی‌نمایند.

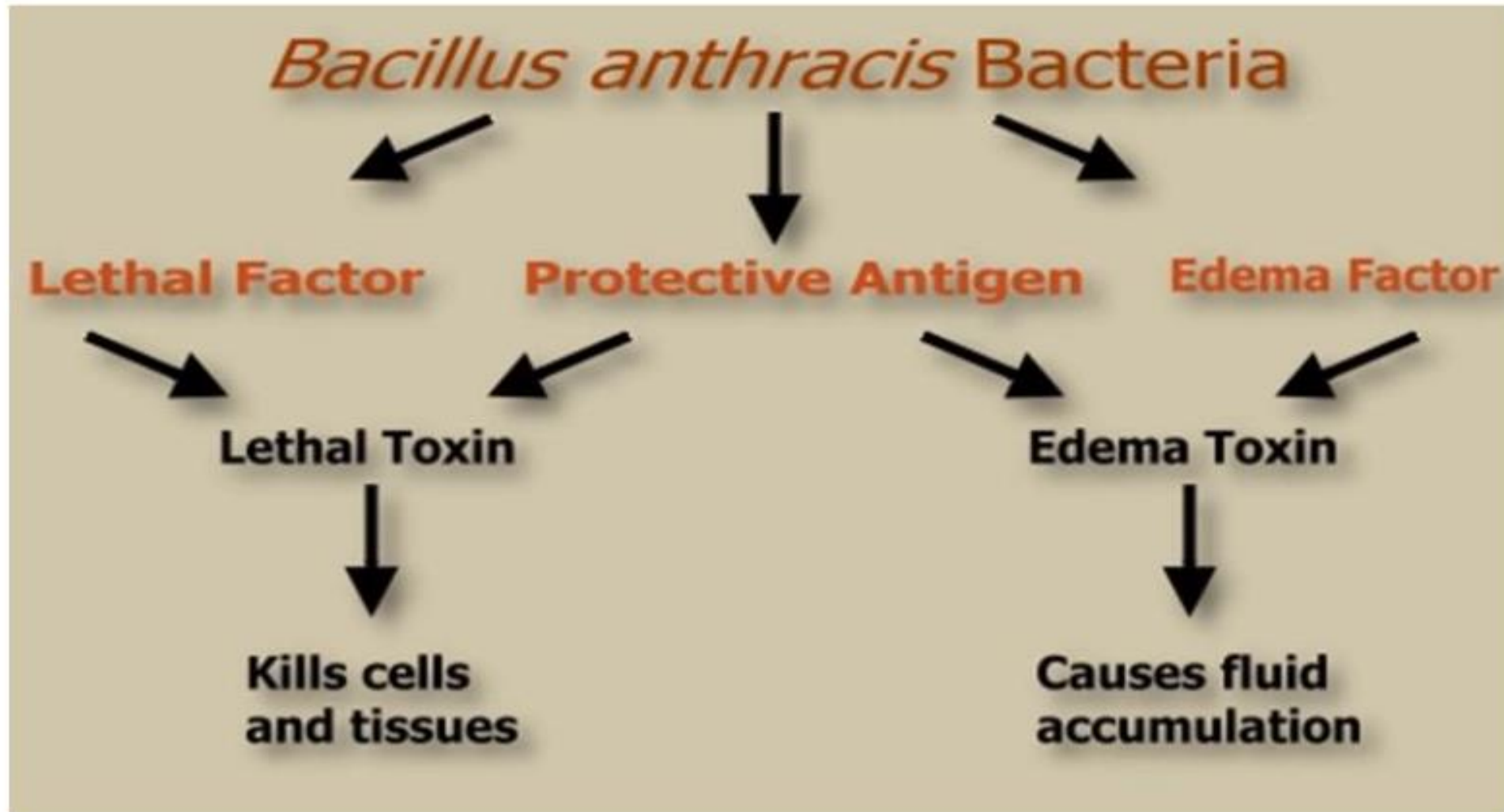


Bacillus anthracis

- Characteristics
 - GPR
 - FA
 - Capsule
 - Spore: central endospore
 - Nonmotile
- Reservoir, zoonotic
 - Hoof stock (sheep, cattle, goats)
 - Fur, hides (textile workers)
 - Soil contaminated with spores
- Virulence
 - Capsule
 - Spore
 - Exotoxin (anthrax toxin)
 - Necrosis
 - Edema
 - Protective Ag



Pathogenicity



B. cereus

- Characteristics
 - Aerobic
 - Non-encapsulated
 - Motile
 - spore
- Virulence
 - Spores
 - Enterotoxins
 - Hemolysins
 - Lecithinase (pLC)
- Dz
 - Food poisoning
 - Catheter sepsis
 - Ocular infections

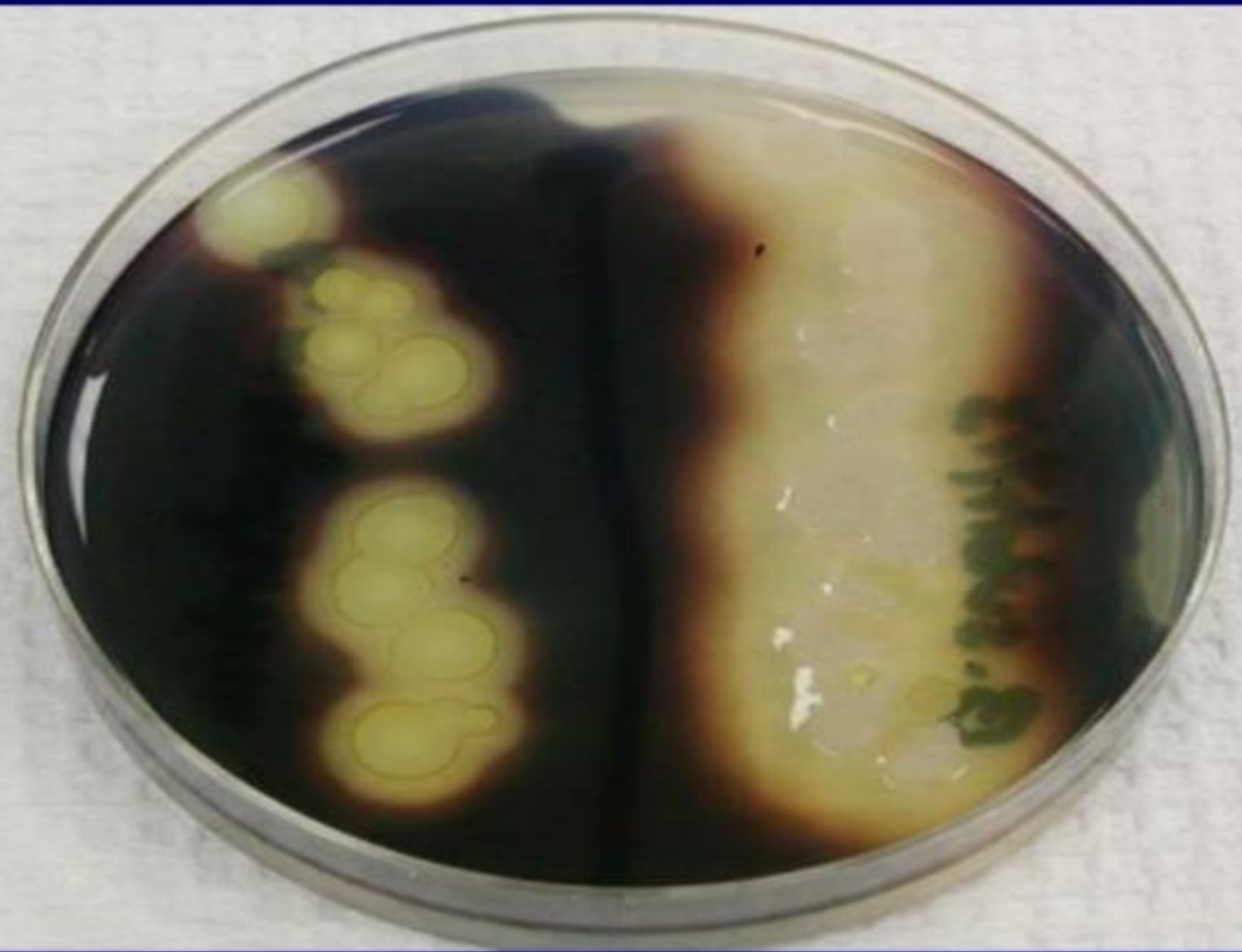


B. subtilis

- Location
 - Soil
 - Decaying organic matter
- Nonpathogenic
 - Research organism
 - Endospores
 - antibiotics
 - Commercial use
 - Enzyme production
 - Insect toxin
 - Fungicide
- Food spoilage



B. MEGATERIUM



B. SUBTILIS

Starch hydrolysis (+) / amylase
Activity

Table 6.9a. *Second-stage table for Bacillus species*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Gram reaction	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	d	d	-	d	+	-	-	d	+	d	d	d
Chains of cells	+	+	+	+	d	d	+	+	d	d	d	d	d	d	-	d	-	-	-	-	+	d	-	d
Motility*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell length > 3µm	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	+	-	+	d	d	d	d	d	+	+	-	-	-
Spore position and shape	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VTX	TYX	VX	VX	VTX	VX	VX	VX	TY	VTX	VX	VX	VTX
Swelling of cell body by spore	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+
Growth at 50 °C	-	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	-	+	d	-	+	-	-	d	+	+	+
Growth in 10% NaCl	+	d	d	d	+	-	-	+	d	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobic growth	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	-	-
Carbohydrates, acid from ASS:																								
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
cellobiose	-	d	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	-	+	-	+	d	+	+	-	-	d	d	d
galactose	-	-	d	-	-	d	+	+	d	+	d	d	-	d	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
mannose	-	-	-	d	d	+	d	+	+	+	d	+	d	d	-	+	d	+	+	-	-	+	d	+
melibiose	-	-	-	-	-	d	+	d	d	d	d	+	-	d	-	+	-	+	+	-	-	d	-	+
raffinose	-	-	-	-	-	-	d	+	+	d	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	d	d	+
salicin	-	+	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	d	d	-	+	d	+	+	-	-	d	+	d
xylose	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+	d	d	-	-	-	+	-	+	+	-	-	d	+	-
ONPG	-	-	d	-	d	+	+	+	+	+	d	d	d	d	d	+	-	+	+	-	-	d	-	-
Utilization of citrate	-	d	d	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	-	d	-	-	-	d	d	-	-	-	-
Urease	-	d	d	-	-	+	d	-	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-	-	-	+	+	d	+	d	d	+	-	d	+	d	+	-	-	d	+	d
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	+	d	d	-	d	d	+	+	+	d	-	+	-	d
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	-	+	+	d	-	-	d
Hippurate hydrolysis	-	-	-	-	+	+	-	+	d	-	-	+	-	+	+	-	d	d	-	-	d	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Oxidase	d	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	+	-	+	d	-	-	-

1 *Bacillus anthracis*

2 *Bacillus cereus*; *B. anthracoides*

3 *Bacillus mycoides*

4 *Bacillus thuringiensis*

5 *Bacillus firmus*

6 *Bacillus lentus*

7 *Bacillus megaterium*

8 *Bacillus pumilus*

9 *Bacillus subtilis*

10 *Bacillus licheniformis*

11 *Bacillus amyloliquefaciens*

12 *Bacillus coagulans*

13 *Bacillus pantothenicus*

14 *Bacillus alvei*

15 *Bacillus brevis*

16 *Bacillus circulans*

17 *Bacillus laterosporus*

18 *Bacillus macerans*

19 *Bacillus polymyxa*

20 *Bacillus sphaericus*

21 *Bacillus badius*

22 *Bacillus stearothermophilus* (Group I: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).

23 *Bacillus stearothermophilus* (Group II: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).

24 *Bacillus stearothermophilus* (Group III: Wolf & Barker, 1968; Walker & Wolf, 1971).



با سپاس از توجه شما
در ستم من! یانه سپاس