



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه باکتری شناسی ۱

انجام آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی کورینه باکتری ها



Corynebacterium

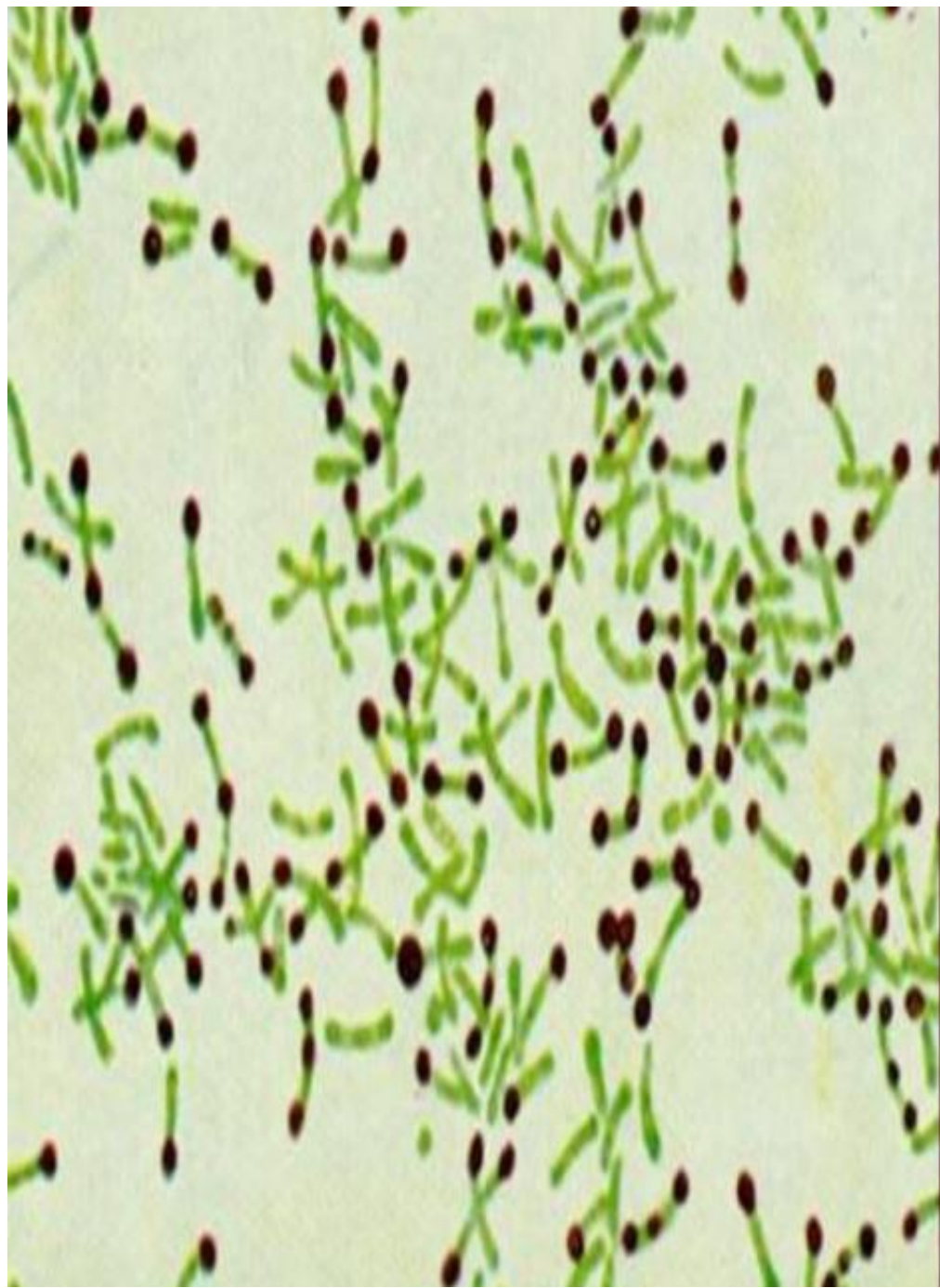
خصوصیات کورینه باکتریوم دیفتریه

1- باسیل گرم مثبت، چماقی شکل و به شکل حروف چینی دیده میشود. ظاهری دندانه دار و تسبیح مانند (گرانول متاکروماتیک) دارد.

2- بدون حرکت، بدون اسپور، غیر اسید فست و بدون کپسول است.

3- هوازی و یا بی هوازی اختیاری است و در 37 درجه سانتی گراد (حداقل 20 و حداکثر 40 درجه) رشد میکند.

4- در محیط بلاد اگر بعد یک روز انکوباسیون کلنی های کوچک 1-3 میلیمتری، دانه دار، خاکستری و بعضا با حاشیه باریکی از همولیز ایجاد می کند.



خصوصیات کست خورینه باکتریوم دیفتریه

5- برای جلوگیری از رشد استرپتوکوک ها و پنوموکوک از محیط های لوفلر و تلوریت دار استفاده می شود.

- در محیط لفلر کلنی های کوچک ،دانه دار ،خاکستری با لبه نا منظم ایجاد میکند.

- در محیط تلوریت دار (محیط های تینسدال و آگار سیستتین-تلوریت) بعد از 36-48 ساعت انکوباسیون، کلنی خاکستری مایل به سیاه ایجاد کرده ، تلوریت پتاسیم را در درون سلول احیاء میکند.

Löffler's Serum for
Corynebacterium diphtheriae



6- توکسین دیفتری توسط فاز لیزوژنیک منتقل میشود

7- کربوهیدراتها را تخمیر کرده کاتالاز (+) است.



Blood Agar



Tinsdale Agar

after 72 hours of cultivation



Gram stain
(x1000)

"club" shape



24 hours

agar plate with sheep blood (cultivation 24 hours; 37°C; 5% CO₂)

Corynebacterium diphtheriae
nontoxinogenic strain

گونه های مختلف کورینه باکتریوم

C. diphtheriae

Diphtheria exotoxin

C. jeikeium

Antibiotic resistance

C. urealyticum

Antibiotic resistance; urease
production

C. pseudotuberculosis

Diphtheria exotoxin;
phospholipase D

C. ulcerans

Diphtheria exotoxin;
phospholipase D

خصوصیات نژاد های توکسیژنیک در محیط تلوریت پتاسیم



Corynebacterium diphtheriae

1- کلنی نوع گراویس Gravis:

کلنی های درشت، تخت و کدر (با قطر 2-4 میلی متر)، حاشیه نامنظم خشن، خاکستری تیره تا سیاه (Gun metal gray) به گل مینا تشبیه شده است.

2- کلنی نوع میتیس Mitis:

کلنی در اندازه (2-5/1 میلی متر)، نرم، محدب، مرکز کلنی سیاه و براق، حاشیه صاف و منظم و کمرنگ تر با بوی شبیه bleach، همولیز بتا ممکن است دیده شود.

3- کلنی نوع اینتر مدیوس Intermedius:

کلنی های به قطر 1-5/0 میلی متر، کلنی دارای مرکز سیاه و حاشیه خاکستری، تخت، نرم یا خشن. کلنی را به تخم قورباغه یا خاویار تشبیه کرده اند.

- تیپ کلنی با شکل اختصاصی بیماری مرتبط نیست ولی بر اساس مطالعات انجام شده درصد سویه های حامل ژن توکسین در میان تیپ ها متفاوت است

خصوصیات نژاد های توکسیژنیک در محیط مایع

-1 Gravis :

در محیط مایع به صورت ورقه ورقه نازک رشد میکند.

-2 Mitis :

به صورت انتشار یکنواخت رشد میکند.

-3 Intermedius :

به صورت دانه های ته نشین شده دیده میشود.

اپیدمیولوژی کورینه باکتریوم دیفتریه

8- انسان تنها میزبان آن است.

9- از طریق قطره های تنفسی با پوست آلوده منتقل میشود.

10- در مناطق اندمیک در گلو و بینی ناقلین سالم حمل میشود.

11- نسبت به خشکی مقاوم است. چندین هفته در گرد و غبار و مواد آلوده باقی میماند

بیماری زایی کورینه باکتریوم دیفتریه

● پاسخ میزبان چیست؟

1- التهاب در گلو که با غشای کاذب همراه است. (غشای کاذب از باکتری، لنفوسیت، پلازما، فیبرین و سلولهای مرده تشکیل شده است.)

2- تولید آنتی بادی

✓ آزمایش Schick وضعیت ایمنی شخص را مشخص میکند.

تست پوستی شیک (Shick)

- اگر فردی به بیماری دیفتتری مبتلا شده باشد، ایمنی نسبت به بیماری در وی ایجاد می گردد. این ایمنی به علت وجود آنتی توکسین در بدن بیمار می باشد. برای پی بردن به وجود ایمنی می توان از تست پوستی شیک استفاده کرد.
- مقدار استاندارد از توکسین دیفتری را به داخل پوست فرد تزریق می نمایند. چنانچه بیمار ایمن باشد هیچ نوع عکس العمل پوستی ظاهر نمی شود، زیرا توکسین با آنتی توکسین بدن فرد خنثی می شود اما اگر بیمار مصون نباشد، پوست محل تزریق، قرمز و متورم می شود که در اینصورت تست مثبت است.

SKIN RESPONSE*

	TOXIN		Toxoid		Interpretation
	36 h	120 h	36 h	120 h	
POSITIVE REACTION	-	+	-	-	Nonimmune, Nonsensitive
NEGATIVE REACTION	-	-	-	-	Immune, Nonsensitive
PSEUDO REACTION	+	-	+	-	Immune, Sensitive
COMBINED REACTION	+	+	+	-	Nonimmune, Sensitive

یافته های بالینی و عوارض بیماری دیفتری

❖ یافته های بالینی دیفتری : غشای کاذب ، تب ، گلو درد ، آدنوپاتی گردنی

❖ عوارض مهم :

✓ انسداد راه هوایی در اثر وسعت غشای کاذب به حنجره و نای

✓ میو کاردیت و کولاپس گردش خون (50% علت مرگ)

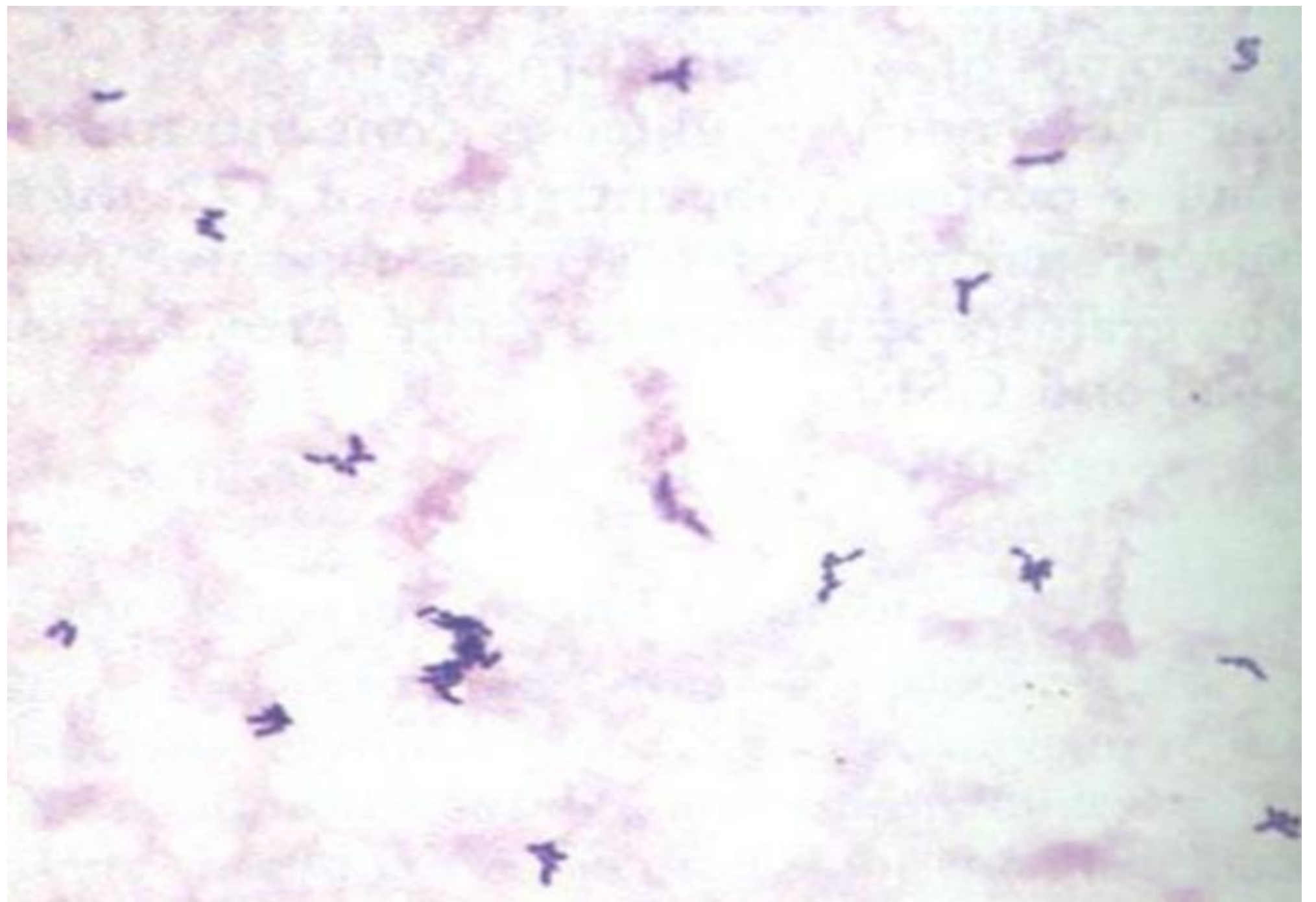
✓ فلج عصب راجعه حنجره

□ دیفتری پوستی : فقط ضایعات زخمی ایجاد کرده و علائم سیستمیک ایجاد نمیکند.

□ سویه های غیر توکسین زا باعث سپتی سمی ، اندوکاردیت ، استئو میلایت و آبسه میشوند.

تشخیص از مایشگاهی کورینه باکتریوم دیفتریه

- نمونه : سواب های گلو ، حفره بینی ، حنجره و پوست
- رنگ آمیزی نمونه: با رنگهای البرت ، نایسر ، متیلن بلو و گرم
- کشت: در محیط های کشت لوفلر (12-18 ساعت بعد ساب کالچر میشود) ، سیستئین تلوریت بلاد اگار و بلاد اگار
- تشخیص توکسین زائی :
 - 1- تست خنثی سازی با استفاده از خوکچه هندی و بصورت زیر جلدی
 - 2- تست ELEK (یک تست ایمنودیفیوژن) – نوار پرسپیتاسیون بین کاغذ صافی اغشته به آنتی توکسین و توکسین موجود در کشت خطی کلنی مشکوک بعد از 4 ساعت گرمخانه گذاری ظاهر میشود.
 - 3- خنثی سازی در کشت سلولی با استفاده از آنتی توکسین اختصاصی
 - 4- تعیین مستقیم ژن tox در نمونه های کلینیکی توسط PCR



روش رنگ آمیزی آلبرت

- لام را بمدت 6 تا 8 دقیقه در مجاورت رنگ آلبرت قرار دهید.
- رنگ را خالی کرده و بدون شستشو بر روی آن محلول لوگل بمدت 2 تا 3 دقیقه بریزید.
- لام را شسته و پس از خشک کردن در زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.
- باسیل دیفتری با این روش به رنگ سبز کمرنگ و دانه های متاکروماتیک آن به رنگ آبی مایل به سیاه دیده می شوند.
- از کلنی های خاکستری رنگ باکتریهای کشت شده در محیط لوفلر، حداکثر پس از 18 ساعت می توان لامی تهیه کرده و مجدداً به روش آلبرت رنگ آمیزی کرد.
- رنگ آمیزی گرم: باسیلهای دیفتری، رنگ خود را به سرعت در مجاورت محلولهای بیرنگ کننده از دست می دهند، لذا در هنگام رنگ آمیزی گرم نباید لام را زیاد در مجاورت الکل قرار داد.

رنگ آمیزی آلبرت



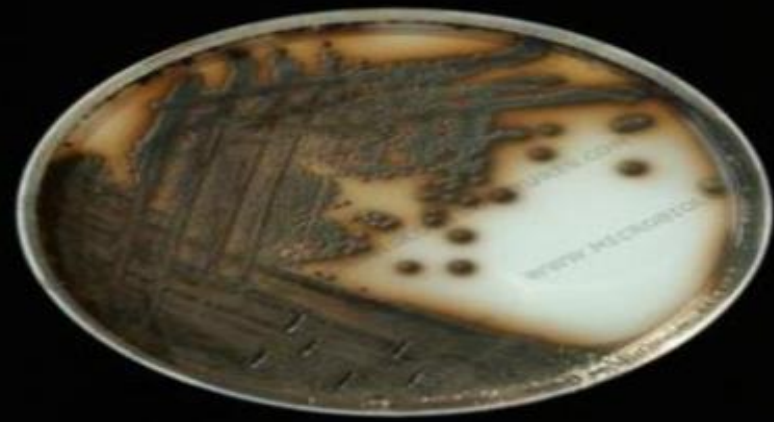
محیط های کشت کورینه باکتریوم دیفتریه

- محیط کشت " لوفلر " : حاوی سرم اسب و تخم مرغ. رشد کورینه باکتریوم دیفتریه و تشکیل دانه های متاکروماتیک در داخل جسم باکتری را تقویت میکند. کلنی بعد 24 ساعت در 37 درجه بصورت کلنی های محدب گرمی ، طوسی و به اندازه 1 میلیمتر ظاهر میشود . از رشد باکتری های تنفسی جلوگیری میکند.
- تلقیح نمونه برداشتی از گلو توسط سواب به سطح محیط " لوفلر " و انتقال هر گونه رشد از آن، پس از یک شب انکوباسیون به محیط کشت "تلوریت پتاسیم" امکان جداسازی کورینه باکتریوم دیفتریه را افزایش می دهد .
- تلوریت پتاسیم محیط آگار خونداري است که به نسبت 4/1. به آن تلوریت اضافه شده است . بر روی این محیط باسیل دیفتري و بعضي از دیفتروئیدها و کوکسیها قادر به رشدند. کلنی کورینه باکتریوم دیفتریه بعد 24 ساعت به صورت خاکستري تاسیاه مشاهده می شود .
- " سیستین تلوریت بلاد آگار " : کلنی های سیاه یا خاکستری رنگ ایجاد میکند.
- محیط " تینسدال آگار " : دارای خون گوسفند، سرم گاو، سیستین، و تلوریت پتاسیم است بعنوان محیط کشت انتخابی و افتراقی به کار می رود. کلنی های سیاه رنگ با هاله قهوه ای تشکیل می دهند.

Egg cystine serum tellurite)E.C.S.T • (broth

- این محیط که یک محیط غنی کننده برای یافتن ناقلین کورینه باکتریوم دیفتریه می باشد. محتوی این محیط از سرم گاو، زرده تخم مرغ، تلوریت پتاسیم، سیستین و گلوکز می باشد.

Löffler's Serum for *Corynebacterium diphtheriae*



Corynebacterium diphtheriae



Corynebacterium diphtheriae

واکنش‌های بیوشیمیایی برخی از کورینه باکتریها

هیدرولیز خون	(C) سیستیناز	مابعد کردن ژلاتین در ۲۲ درجه	تولید اوره آز	تولید اسید از					نوع ارگانیزم
				نشاسته	تری مالوز	ساکارز	مالتوز	گلوکز	
+/-	+	-	-	+	-	-(a)	+	+	C.diphtheria gravis
-	+	-	-	-	-	-	+	+	intermedius
+	+	-	-	-	-	-	+	+	mitis
+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	C.ulearans
+	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+	+	C.haemolyticus ^(b)
+	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+	+	C.pyogenes ^(b)
+	+	+/-	+	-	-	+/-	+	+	C.ovis
-	-	-	+	-	-	-	-	-	C.hofmani
-	-	-	-	-	-	+	+	+	C.xerosis
-	-	-	-	-	+/-	-	+/-	+	Jk group

هیدرولیز ژلاتین

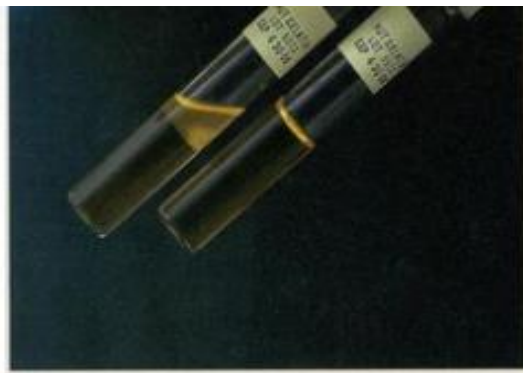
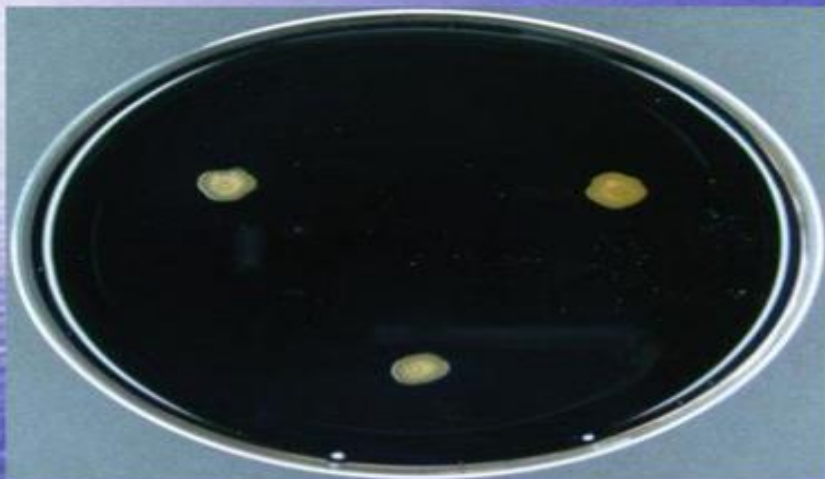
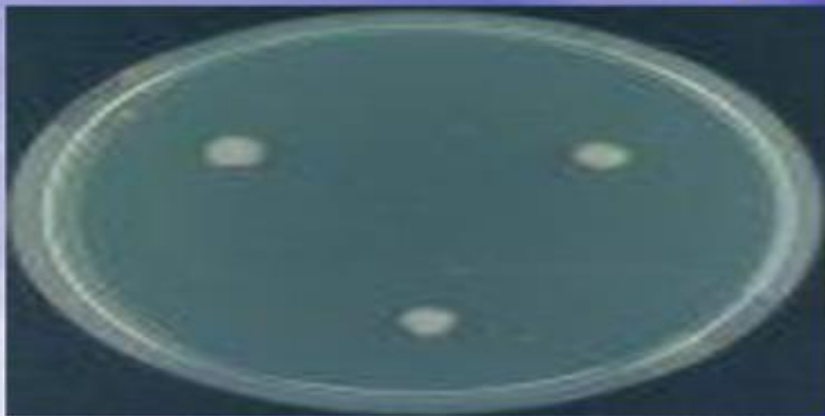


Figure 13-17 Gelatin hydrolysis. A. Positive; note liquefaction at top of tube. B. Uninoculated tube.

- نوع و ظاهر محیط: محیط ژلاتین بصورت لوله ای و جامد عمقی
- مواد موجود: ژلاتین و مواد غذایی
- فاکتور مورد بررسی: وجود آنزیم ژلاتیناز
- روش کشت: در لوله های حاوی محیط نوترینت ژلاتین کلنی مورد نظر را بصورت عمقی کشت داده و حداقل 24 ساعت در دما های 37 درجه، دمای اتاق و 4 درجه نگهداری می کنیم.
- نکته: ابتدا کشت در 22 درجه سانتیگراد به مدت 48 ساعت نگهداری شده و سپس آن را در دمای 4 درجه سانتیگراد به مدت 30 دقیقه قرار می دهیم و یا جهت کشت سه نمونه تهیه کرده لوله اول را در یخچال ، لوله دوم را در 37 درجه و لوله سوم را در دمای اتاق قرار می دهیم
- **حالاتهای ممکن:** چنانچه بعد از مدت مذکور محیط ها به حالت مایع درآید(حتی در یخچال) ← ژلاتیناز مثبت قوی
- در صورت جامد بودن:
- 5 روز گرمخانه گذاری ← مایع: مثبت ضعیف

هیدرولیز نشاسته



- نوع و ظاهر محیط: جامد در پلیت

- فاکتور مورد بررسی: آنزیم آمیلاز

- معرف محیط: لوگل

- روش کشت: نمونه را در محیط حاوی

نشاسته کشت می دهیم و در 37 درجه

سانتی گراد بمدت 24 ساعت قرار می

دهیم. سپس روی آن لوگل می ریزیم.

- حالت‌های ممکن:

– عدم تغییر رنگ (نتیجه مثبت)

– تولید رنگ آبی تیره یا بنفش

(نتیجه منفی)

- نکته: نتیجه آزمایش را بایستی بلافاصله پس

از ریختن ید قرائت کرد زیرا ممکن است

رنگ از بین برود

مصرف کربوهیدرات ها

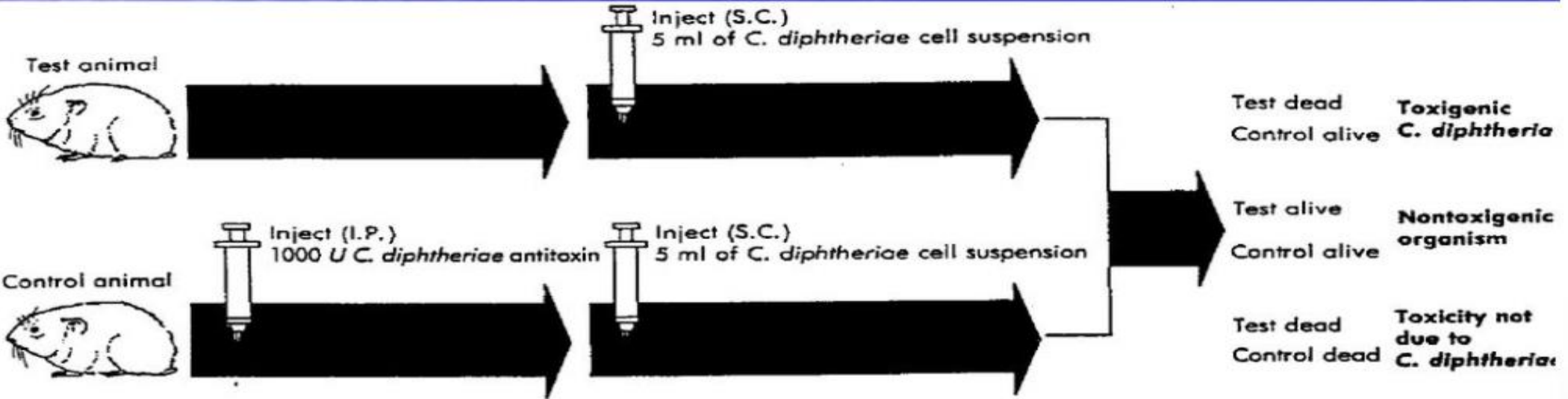
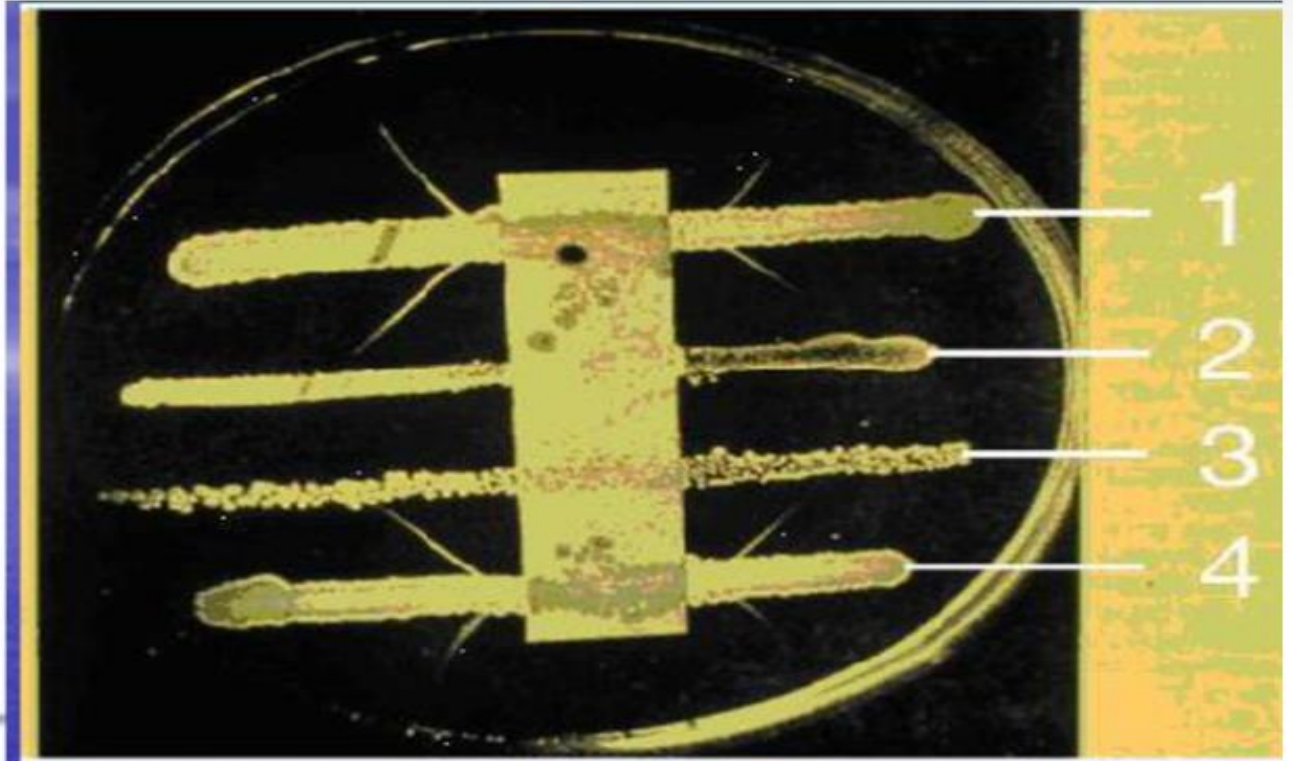
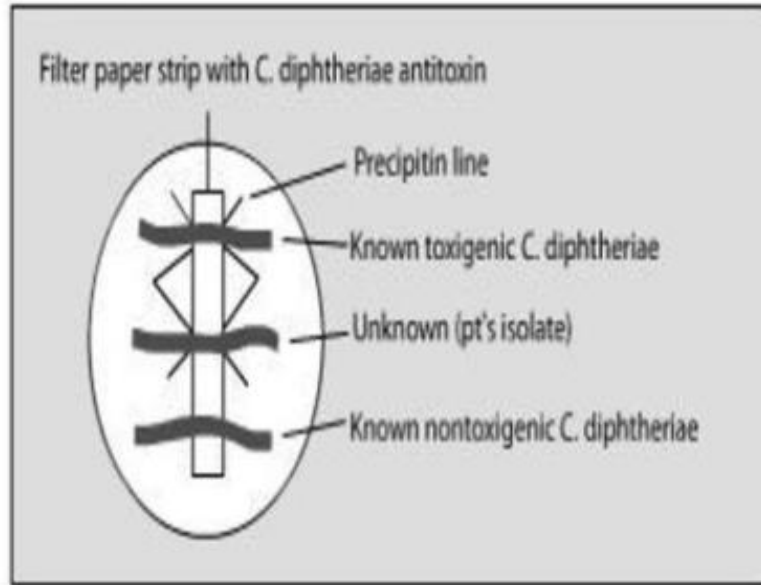
- از محیط فنل رد برای بیس قند دار استفاده می شود. این محیط دارای 1% از کربوهیدرات مورد نظر (گلوکز، مالتوز و سوکروز) همراه با معرف فنل رد می باشد. چنانچه ارگانیزم کربوهیدرات را مصرف کند پس از 24 تا 72 ساعت رنگ زرد ایجاد خواهد شد



آزمایش توکسین زایی (ELEK)

- باکتریها (باکتری کنترل و باکتری مشکوک) در محیط کشت دارای اندکی آهن کشت داده می شود. کشت روی یک پلیت به صورت دو خط موازی با یکدیگر و فاصله 10mm انجام می شود.
- یک نوار کاغذی حاوی آنتی توکسین در مرکز پلیت به صورت عمود بر دو خط کشت شده قرار داده می شود
- سپس پلیت را در دمای 35° قرار داده و پس از 18-24 و 48 ساعت بررسی می کنیم. خطوط رسوبی در زیر نور و در مقابل یک زمینه تاریک بهتر مشخص می شود. خط رسوبی سفید رنگ در فاصله 4 تا 5 میلی متری نوار کاغذی و با زاویه 45° نسبت به خط کشت قرار می گیرد.
- اگر باکتری مشکوک توکسین زا باشد خط رسوب مربوط به نمونه کنترل مثبت به خط رسوبی باکتری مورد نظر متصل شده و قوس مشخصی را بوجود می آورد

ELEK test



Corynebacterium jeikeium (group JK) (Lipophilic)

- Septicemia ,pneumoniae, endocarditis ,wound infections ,foreign body infection
- بخشی از فلور طبیعی پوست در زیر بغل ، مقعد و کشانه ران است(در 40% افراد).
- در بیماران دارای نقص ایمنی ، دارای کاتتروریدی و یا مبتلا به لوسمی یا نوتروپنی بستری در بیمارستان که آنتی بیوتیک وسیع الطیف استفاده می کنند باعث عفونت میشود.
- نسبت به آنتی بیوتیک ها بسیار مقاوم است.
- ونکومايسين داروی انتخابی است . داروی در رده دوم سیپروفلوکساسین است.

C.urealyticum (group DZ) (Lipophilic)

UTI , struvite calculi, Septicemia ,
endocarditis ,wound infections

- معمولا در افراد سالم ایزوله نمی گردد.
- عامل UTI می باشد. تولید اوره از قوی کرده که با قلیایی کردن ادرار در تشکیل سنگ ادراری struvite calculi نقش دارد.
- فاکتور های خطر در ابتلا به عفونت نقص ایمنی، اختلالات زمینه ای دستگاه ادراری، عمل جراحی قبلی در دستگاه ادراری و سابقه استفاده از آنتی بیوتیک است
- نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم است

Corynebacterium minutissimum

(Lipophilic-fermentative)

Wound inf. Respiratory Tract inf. Erythrasma

- اریتراسما یک عفونت سطحی در در پوست کشانه ران و زیر بغل است که منشا چند میکروبی دارد.
- در محل عفونت قرمزی و پوسته شبیه روغن و براق مشاهده میشود.
- نمونه برداری توسط نوار سلوفان انجام شده و بعد از قرار دادن روی لام رنگ آمیز گرم، متیلن بلو و یا گیمسا میشود
- باکتری رنگ پورفیرین تولید می کند لذا لزیون های اریتراسما در لبه ها برنگ قرمز مرجانی فلورسنس هستند.

Other Non-Lipophilic & fermentative Corynebacterium species

➤ **C. ulcerans**

➤ Respiratory diphtheria

-می تواند ژن tox را حمل کند.

-بیماری مشابه دیفتری ایجاد می کند.

➤ **C. pseudotuberculosis**

Lymphadenitis, abscesses

-می تواند ژن tox را حمل کند

-بندرت در عفونت انسان نقش دارد

Other Non-Lipophilic & fermentative Corynebacterium species

➤ *C. amycolatum*

Wound inf. Septicemia , UTI, Respiratory Tract inf.

- فقط فلور طبیعی سطح پوست است.
- از نمونه های بالینی بسیار ایزوله میشود ولی با گونه های دیگر اشتباه می شود.
- پاتوژن فرصت طلب است.
- نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم است.

➤ *C. striatum*

Wound infections, Respiratory tract infections, foreign body infection

Other Non-Lipophilic & Non-fermentative *Corynebacterium* species

➤ *C. glucuronolyticum*

UTI (men)

- اوراز مثبت است.

➤ *C. auris*

Otitis (in children)

➤ *C. pseudodiphthericum*

Respiratory Tract inf.

Other Non-Lipophilic & Non-fermentative Corynebacterium species

➤ *C. glucuronolyticum*

UTI (men)

- اوراز مثبت است.

➤ *C. auris*

Otitis (in children)

➤ *C. pseudodiphthericum*

Respiratory Tract inf.

طرحی برای شناسایی احتمالی کورینه باکتریوم دیفتریه

