



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 لیستریا

لیستریا (تشخیص آزمایشگاهی، مورفولوژی)

- باسیلهای گرم مثبت، کوتاه (مستقیم یا کمی خمیده) بدون کپسول، بدون اسپور، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت.

- هوازی، بی هوازی اختیاری، در حرارت ۳۷ درجه یا بدون تحرک است یا تحرک بسیار کمی دارد. در حرارت ۲۰ تا ۲۵ درجه کاملا متحرک و دارای ۴ فلاژل است.

تست حرکت لیستریا

لیستریا مونوسایتوژنز در دمای ۲۰-۲۵ درجه حرکت tumbling چرخشی دارد که به راحتی در یک لام مرطوب با قطره معلق مخصوصا از کشت براث انکوبه شده در دمای ۲۵ درجه قابل مشاهده است. در محیط های نیمه جامد حاوی ۰,۲ تا ۰,۴ آثار و در صورت انکوباسیون در ۲۵ درجه حالت چتری شدن در نزدیک به سطح محیط ایجاد می کند. این باکتری در سلول های بدن برای حرکت از یک سلول به سلول دیگر از اسکلت سلولی استفاده می کند.

تمایز جنس لیستریا از جنس های مشابه : برای تمایز لیستریا از جنس های مشابه مانند استرپتوکوکوس اریزی پلوتریکس و لاکتوباسیلوس از تست های تحرک و کاتالاز استفاده میشود. تمایز لیستریا مخصوصا از استرپتوکوکوس اگالاکتیه اهمیت دارد. هر دو باکتری باعث مننژیت نوزادان می شوند. از طرفی در رنگ آمیزی گرم نمونه مغزی نخاعی مشکل است بین کوکسی های گرم مثبت طویل استرپتوکوکوس اگالاکتیه و باسیل های گرم مثبت کوتاه لیستریا مونوسایتوزنز تمایز قائل شد هر دو باکتری بر روی محیط بلاد آکار همولیز بتای ضعیفی را ایجاد میکنند. در هر دو تست CAMP مثبت است. استرپتوکوکوس اگالاکتیه غیر متحرک است اما در مورد لیستریا نیز ممکن است تحرک در ۲۷ درجه مشاهده نشود. برای تشخیص آنها از یکدیگر از تست کاتالاز استفاده می کنند. لیستریاها کاتالاز مثبت ولی استرپتوکوک ها کاتالاز منفی هستند

Table 1. Biochemical properties of *Listeria* species.

Property	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
β-Hemolysis	+	+	+	-	-	-
CAMP reaction						
<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-	-
<i>R. equi</i>	-	+	-	-	-	-
Acid production from						
Mannitol	-	-	-	-	-	+
α-Methyl-D-mannoside	+	-	-	+	+	+
L-Rhamnose	+	-	-	V	V	-
Soluble starch	-	-	ND	-	ND	+
D-Xylose	-	+	+	-	+	-
Ribose	-	V	-	-	-	+
Hippurate hydrolysis	+	+	ND	+	ND	-
Reduction of nitrate	-	-	-	-	-	+

Symbols and abbreviations: +, present; -, absent; CAMP, Christie, Atkins, Munch-Peterson; V, variable; and ND, not determined.

From Swaminathan et al. (1995).

فاکتورهای بیماری زایی لیستریا مونوسیتوژنز

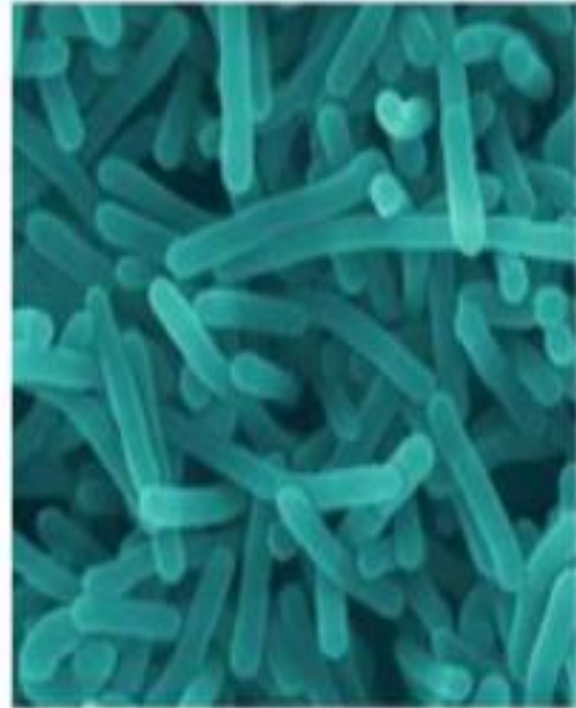
- باکتری داخل سلولی اختیاری بوده که می تواند از عمل پاکسازی وابسته به آنتی بادی بگریزد.
- فسفولیپاز C دارد که بقای باکتری در داخل فاگوزوم را تضمین میکند.
- لیستریولیزین O دارد که تعداد زیادی از اریتروسیت ها را لیز می کند. سبب لیز واکوئل های فاگوسیتوز شده و سبب ورود باکتری به درون سیتوپلاسم سلولهای هدف می شود.
- پروتئین ActA که یک پروتئین سطحی است و سبب پلیمریزه کردن رشته های اکتینی می شود.
- آهن: یک عامل مهم در تهاجم باکتری است.
- گلیسرید A نیز یک جزء دیواره سلولی که سبب تحریک پاسخ مونوسیتیک می شود و در ارتباط با لیستریوز در حیوانات است.

WHO ARE AT RISK WITH LISTERIOSIS

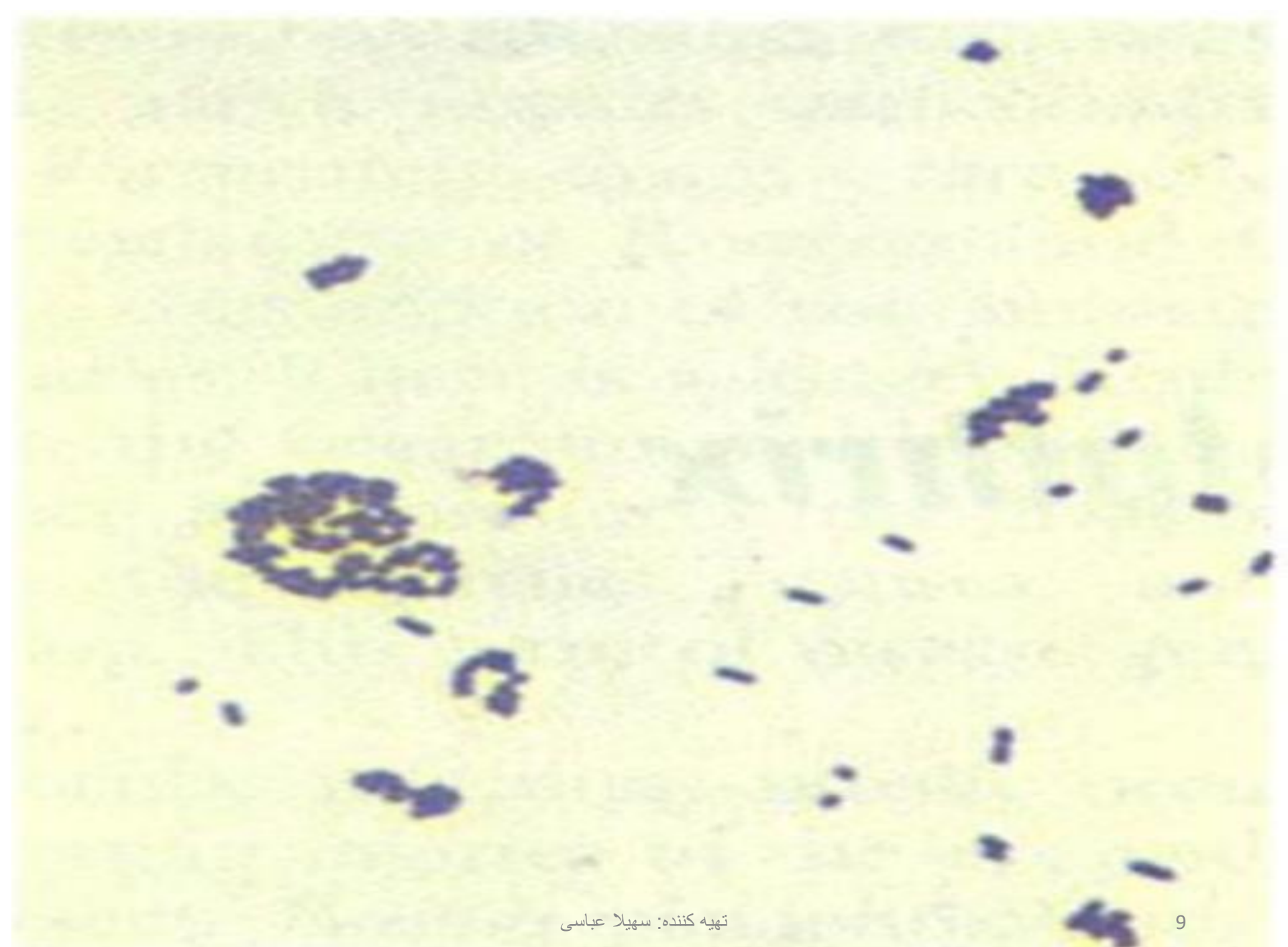
- Pregnant women
- New-borns
- People with weakened immune systems
- People who are taking immuno-suppressing medication.

Listeria monocytogenes

- Facultative anaerobe
- β -hemolytic
- Gram-positive
- Non-acid fast
- Non-sporulating linear rod
- Can grow at temperatures as low as 4°C
- Incubation period of 5-70 days



www.bellenews.com



• دارای چندین گونه به نامهای:

لیستریا مونوسیتوزن

لیستریا ایوانوی

لیستریا اینوکوآ

لیستریا ولشری

لیستریا گرایبی

موارد اول و دوم برای انسان بیماریزا می باشند.

• لیستریوز بیماری مشترک انسان و حیوان است که عامل اصلی

آن لیستریا مونوسیتوزن میباشد.

Listeria monocytogenes

✓ باسیل گرم مثبت، کوچک، دوتایی و یا تک تک و به طول 0.5-2 میکرومتر و عرض 0.4-0.5 میکرومتر است. انتهای برجسته دارد و بدون اسپور است. بعد از کشت بصورت کوکوئید دیده می شود. می تواند بصورت زنجیر های کوتاه دیده شود.

✓ بی هوازی اختیاری است.

✓ در 22 درجه با چهار تاژک حرکت میکند (به حالت ملق زدن) ولی در 37 درجه بی حرکت و یا کم حرکت است.

✓ در محیط Mueller – Hinton رشد میکند.

✓ در بلاد آگار در زیر و اطراف کلنی همولیز ایجاد میکند و در 24 ساعت اول کلنی اب مانند و بعد مات میشود¹ تهیه کننده: سهیلا عباسی

Listeria monocytogenes

✓ در صورتیکه قبل از کشت در 4 درجه نگهداری شود ، بهتر رشد میکند. (Cold enrichment)

✓ کاتالاز (+)، از کربوهیدراتها اسید تولید میکند، گاز تولید نمیکند ، تست کامپ (+)، هیدرولیز هیپورات (+)، رشد در 6.5% نمک (+)، هیدرولیز اسکولین (+) و حرکت چتری در لوله آزمایش (+)

✓ تعیین سروتایپ بر پایه انتی ژن های سوماتیک و فلاژلی است.

✓ 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c and 4d

Listeria monocytogenes

اپیدمیولوژی و روش های انتقال بیماری

- ✓ از خاک، آب، سبزیجات، انواع حیوان و انسان ایزوله میشود.
- ✓ با مصرف پنیر نرم، شیر، گوشت بوقلمون، سبزیجات خام منتقل شده و از طریق جفت مادر به جنین میرسد.
- ✓ در شرایط اسیدی و دمای سرد رشد میکند.
- ✓ اپیدمی در ماه های گرم بیشتر است.
- ✓ نوزادان، زنان باردار، مسن ها و افراد با نقص ایمنی سلولی در معرض بیماری هستند.
- ✓ عفونت اسپورادیک است، در تابستان بیشتر دیده میشود
- ✓ میزان مرگ و میر در بیماری های علامت دار بالاتر از مرگ و میر تقریبا همه بیماریهای منتقله از مواد غذایی است. 20-30%
- ✓ تقریبا 1-5% افراد سالم ناقل هستند

Listeria monocytogenes

یافته های بالینی

✓ لیستریوز پری ناتال عفونتی داخل رحمی است.

(Infantiseptica - granulomatis)

- شروع زودرس باعث سپسیس داخل رحمی و مرگ قبل از زایمان میشود.
در ارگانهای بدن گرانولوم ایجاد میکند. مرگ و میر بالاست
- شروع دیر 2-3 هفته بعد از تولد باعث سندرم مننژیت و یا مننگوانسفالیت و سپتی سمی میشود (ivb).

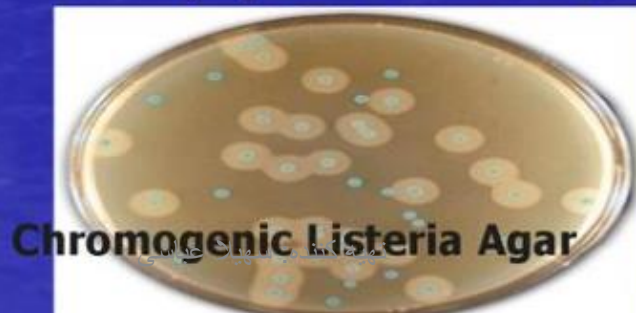
✓ در بزرگسالان اغلب بدون علامت و یا شبیه آنفلوآنزا است

✓ مننگو انسفالیت و باکتری می در بزرگسالان، مننژیت بالغین (در مبتلایان به سرطان، بارداران، دیابتی ها و بیماران با سرکوب سیستم ایمنی)

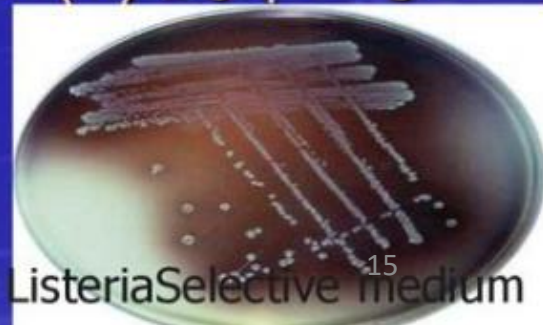
Listeria monocytogenes

تشخیص آزمایشگاهی

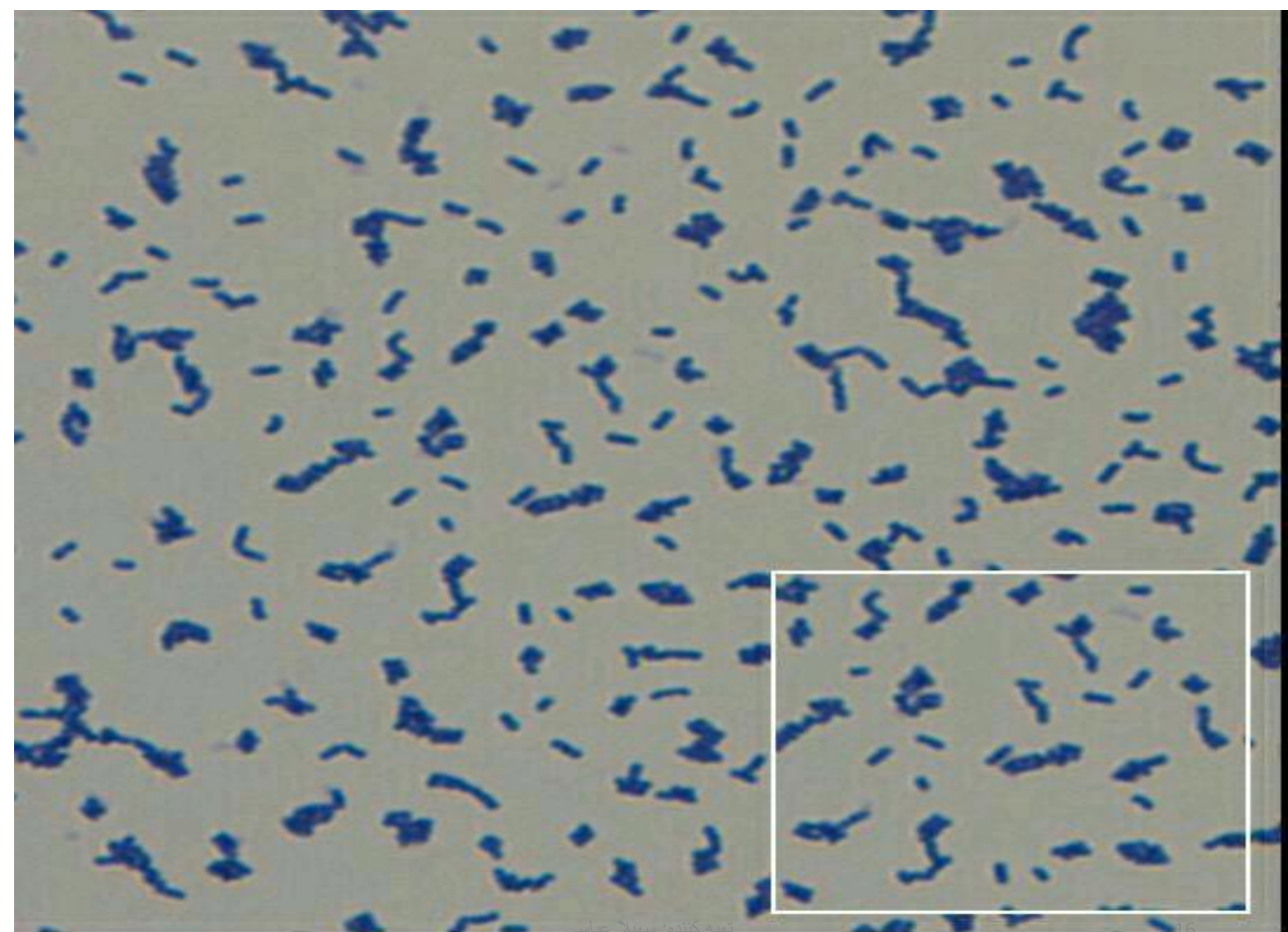
- غلظت در مایع مغزی نخاعی کم است (10^4 عدد در میلیلیتر) و در رنگ آمیزی گرم دیده نمی شود. در صورت دیده شدن به شکل کوکوباسیل های گرم (+) داخل و خارج سلولی دیده میشود.
- بعد از 1-2 روز انکوباسیون در بلاد آگار همولیز بتا ولی ضعیف ایجاد میکند.
- در محیط های انتخابی مانند Oxoid chromogenic Listeria agar و Listeria selective agar رشد میکند
- Cold Enrichment مورد استفاده قرار میگیرد.
- کاتالاز (+)، کمپ (+)، هیدرولیز هیپورات (+)، رشد در 6.5% نمک (+)، حرکت چتری (+)، هیدرولیز اسکولین (+)



Chromogenic Listeria Agar

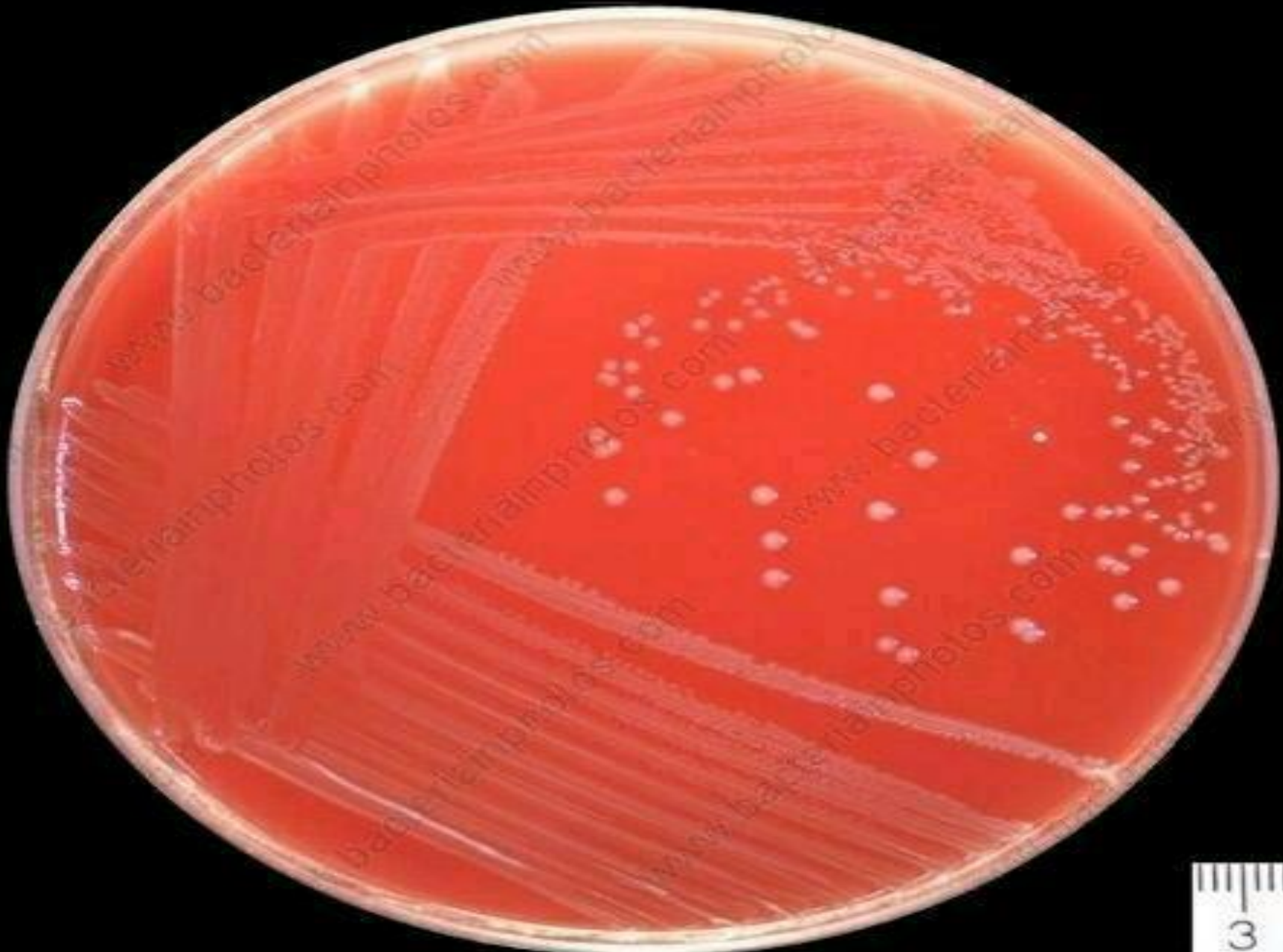


Listeria Selective medium

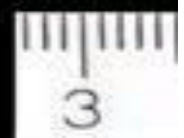


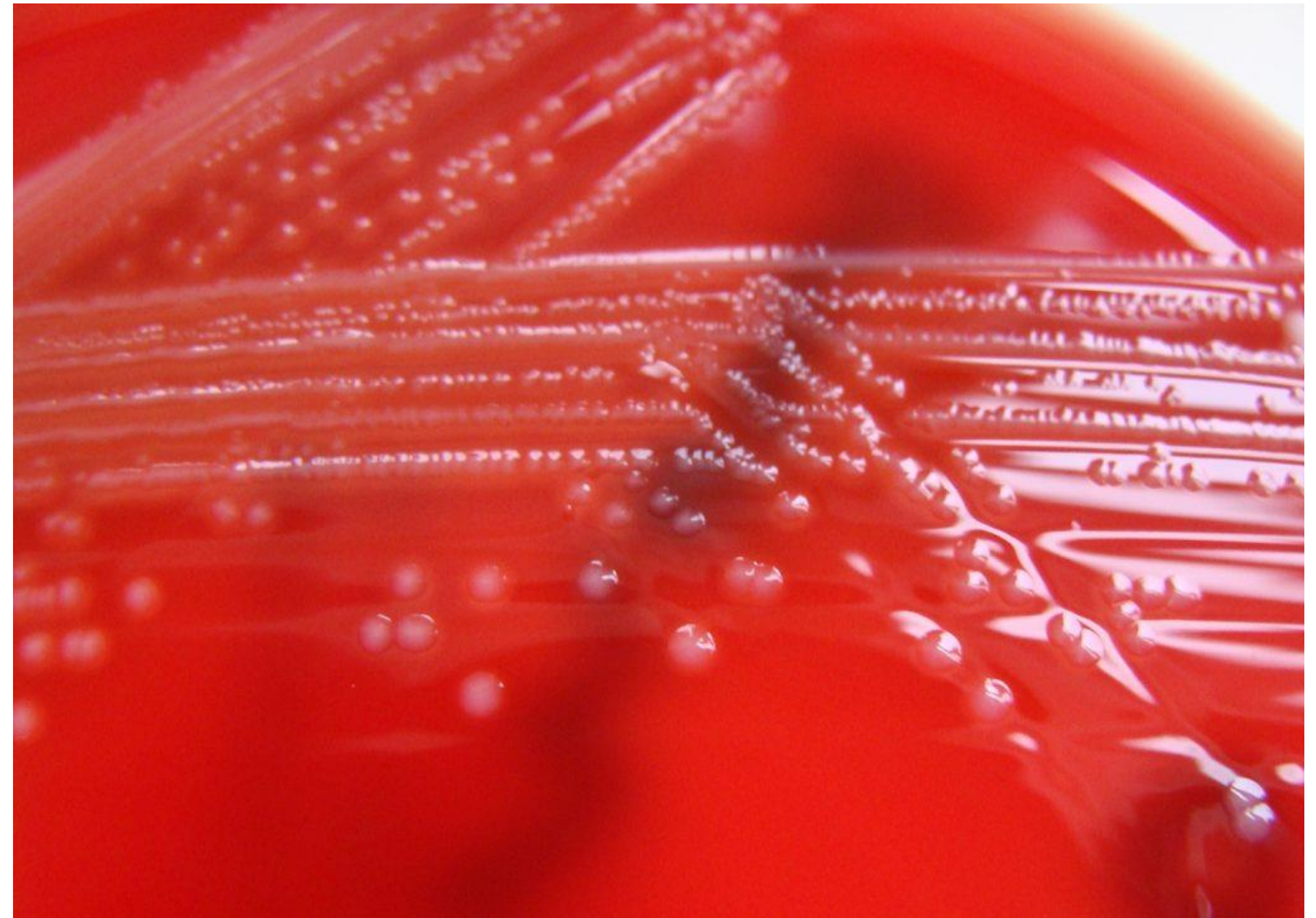
نحوه تشخیص آزمایشگاهی این باکتری:

- این باکتری در محیطهای زیر بخوبی رشد می کند.
- مولر هینتون آگار
آگار خوندار
مکانکی آگار
روی EMB رشد نمی کند.
- لیستریا مونو سیتوزن قادر به ایجاد همولیز بتا(کامل) در آگار خوندار می باشد. و شاید با استرپتوکوک های بتا همولیز اشتباه گردد. این باکتری در دمای ۴ درجه هم می تواند رشد کند.



تهیه کننده: سهیلا عباسی





- برای جداسازی این باکتری بهتر است نمونه ها را چند روز در یخچال ۴ درجه سانتیگراد قرار دهید و سپس اقدام به کشت و جداسازی نمایید روش (cold enrichment)

- بخصوص اگر نمونه ها با میکروبهای دیگر مخلوط باشند این روش بسیار مناسب است.

- در ضمن این باکتری قندهای گلوکز و ترهالوز را نیز اکسید میکند. که برای شناسایی اش میتوان از آن بهره گرفت.

• این باکتری را میتوان از محیط‌های زیر جدا نمود
محیط کشت خون، ادرار، مایع نخاع و جفت.

• برای تفکیک لیستریا از استرپتوکوک های بتا
همولیتیک میتوان از تست کاتالاز استفاده کرد.

OTHER CHARACTERS AND BIOCHEMICAL REACTIONS

- Produces hemolytic colonies
- Ferments Glucose, Maltose, lactose produces acid but no gas
- Listeria Monocytogenes present in the environment
- Saprophyte in soil
- Present in water, sewage.

BIOCHEMICAL REACTIONS



- Bacteria are facultative anaerobic microbes
- Catalase + motile
- Listeria produce acid and not gas in various sugar fermentation tests

افتراق لیستریا منوسیترن و باکتریهای گرم مثبت دیگر

Organism	Catalase	Esculin Hydrolysis	Motility	β Hemolysis	Growth in 6.5% NaCl
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+	+
<i>Corynebacterium</i> spp.	+	-	V	V	V
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	+	V
<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	-	V	+

+, Present or positive; -, absent or negative; V, variable.

*May be weak.

تشخیص آزمایشگاهی

- آزمون های سرولوژی (13 سرووار بخصوص (1/2a,1/2b,4b
- پروفایل های انزیمی (الکتروفورز انزیمی چند کانونی (MLEE)
- آنالیز ژنومی (, PFGE, RIBOTYPING , RAPD) بخصوص جهت سرووار 1/2a
- مقاومت به فلزات (آرسنیک و کادمیموم) جهت تشخیص سویه های مختلف یک سرووار

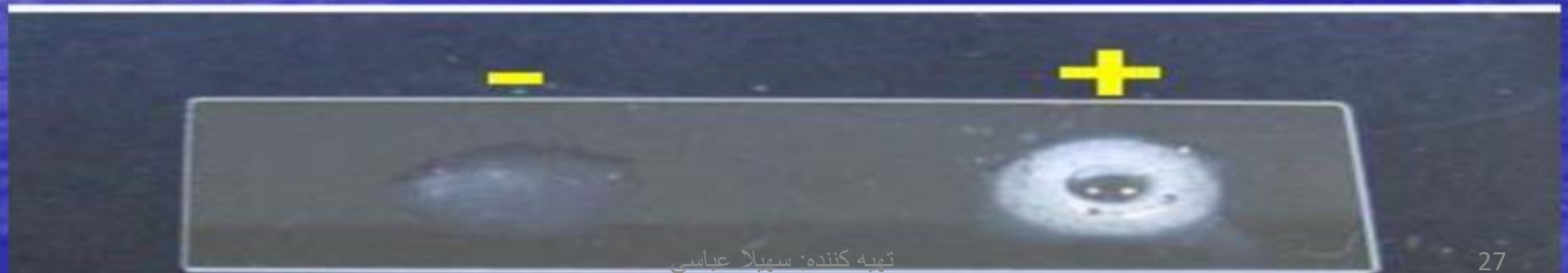
کلنی های بتا همولیز لیستریا



کاتالاز

- با استفاده از این تست می توان وجود آنزیم کاتالاز را در باکتری مشخص نمود.

- در صورتی که باکتری واجد آنزیم کاتالاز باشد ، با اضافه کرن آب اکسیژنه به کلنی برداشته شده باکتری بر روی لام ، واکنش انجام شده به صورت تولید آب و اکسیژن بوده که به صورت حبابهایی نمایان میگردد. در صورتی که باکتری فاقد آنزیم کاتالاز باشد ، بعد از اضافه نمودن آب اکسیژنه ، هیچ گونه تغییری در تولید حباب حاصل از تجزیه آب اکسیژنه به آب و اکسیژن ایجاد نمی گردد، و در نهایت باکتری کاتالاز منفی می باشد



تست CAMP

روش کار:

1- استافیلوکوک اورئوس را در مرکز پلیت अगर حاوی 5% خون گوسفندی قرار دهید.

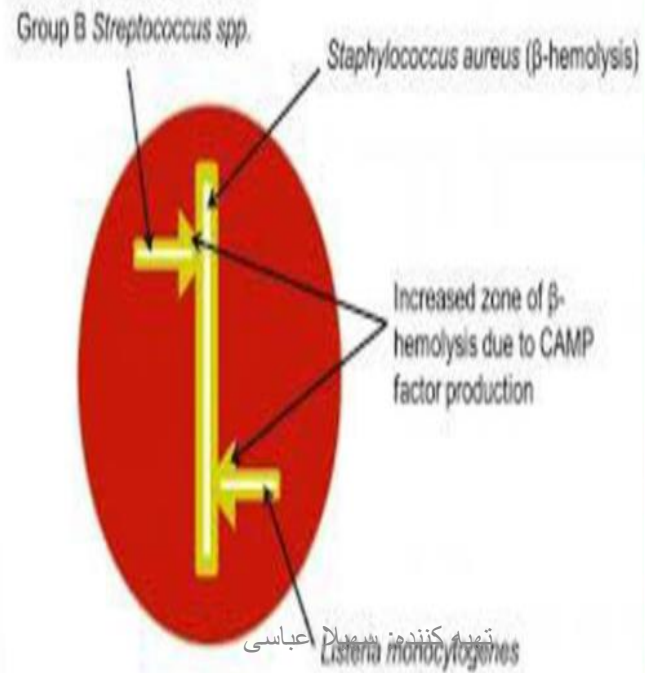
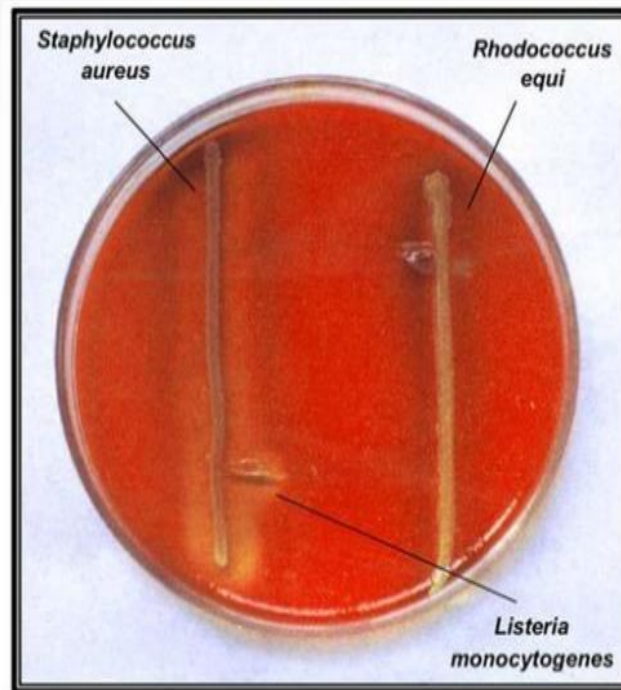
2- عمود بر آن، کلنی مشکوک را کشت دهید بطوریکه استافیلوکوک را قطع نکند.

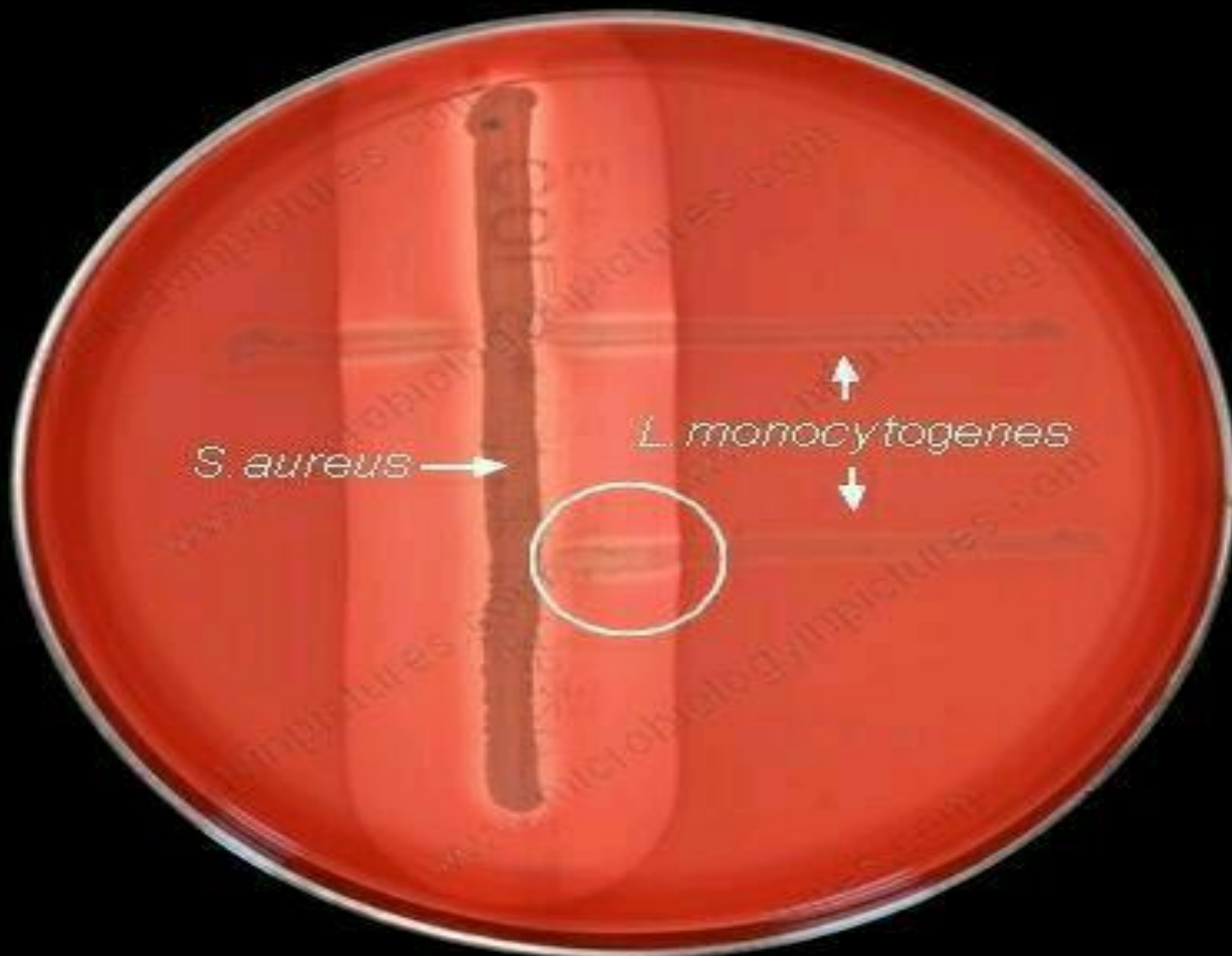
3- پلیت ها را در 35 و یا 37 درجه بمدت 24 ساعت قرار دهید.

4- سپس از نظر تشدید همولیز در محل تقاطع بررسی کنید. همولیزی بشکل فلش در مکان اتصال بین لیستریا منوسایتوژنز و استافیلوکوک ظاهر میشود.

■ همولیزی که لیستریا ایجاد می کند از نوع block type و متفاوت از همولیز پیکانی (arrowhead) ایجاد شده به وسیله استرپتوکوکهای گروه B است.

تست CAMP





هیدرولیز هیپورات

- تعدادی از باکتریها می توانند هیپورات سدیم را هیدرولیز کرده و اسید بنزوئیک و گلیسین تولید کنند. گلیسین توسط عامل اکسید کننده ای به نام نین هیدرین (ninhydrin) ، دی آمینه شده و احیا می گردد و رنگ بنفش ظاهر می شود. محیط کشت باید فقط حاوی هیپورات باشد زیرا نین هیدرین می تواند با هر نوع اسید آمینه دیگری نیز واکنش نماید.

- روش کار: کشت خالص باکتری را در محلول هیپورات سدیم 1% وارد کنید. محلول باید بحالت شیری در آید. لوله ها را در 35 درجه بمدت 2 ساعت قرار می دهیم.

- سپس 0/2 میلی لیتر معرف نین هیدرین اضافه کرده ، بمدت 15 دقیقه در 35 درجه نگهداری می کنیم. در صورت هیدرولیز هیپورات سدیم رنگ بنفش پر رنگ ایجاد میشود.



هیدرولیز اسکولین

- محیط کشت : بایل اسکولین اگار (حاوی 40% صفرا و اسکولین
- مکانیسم: باکتری در حضور صفرا رشد کرده و اسکولین را به اسکولتین و گلوکز هیدرولیز می کند. اسکولتین در آگار پخش شده و با سیترات فریک موجود در محیط ترکیب شده و رنگ سیاه ظاهر می شود.
- روش کار: یک یا دو کلنی از باکتری را بر روی محیط کشت داده و بمدت 24 ساعت در 37 درجه نگهداری کنید. سیاه شدن سطح محیط، دلیل مثبت بودن آزمایش است.
- ممکن است لازم باشد تا 48 ساعت نیز گرمخانه گذاری گردد.



حرکت چتری

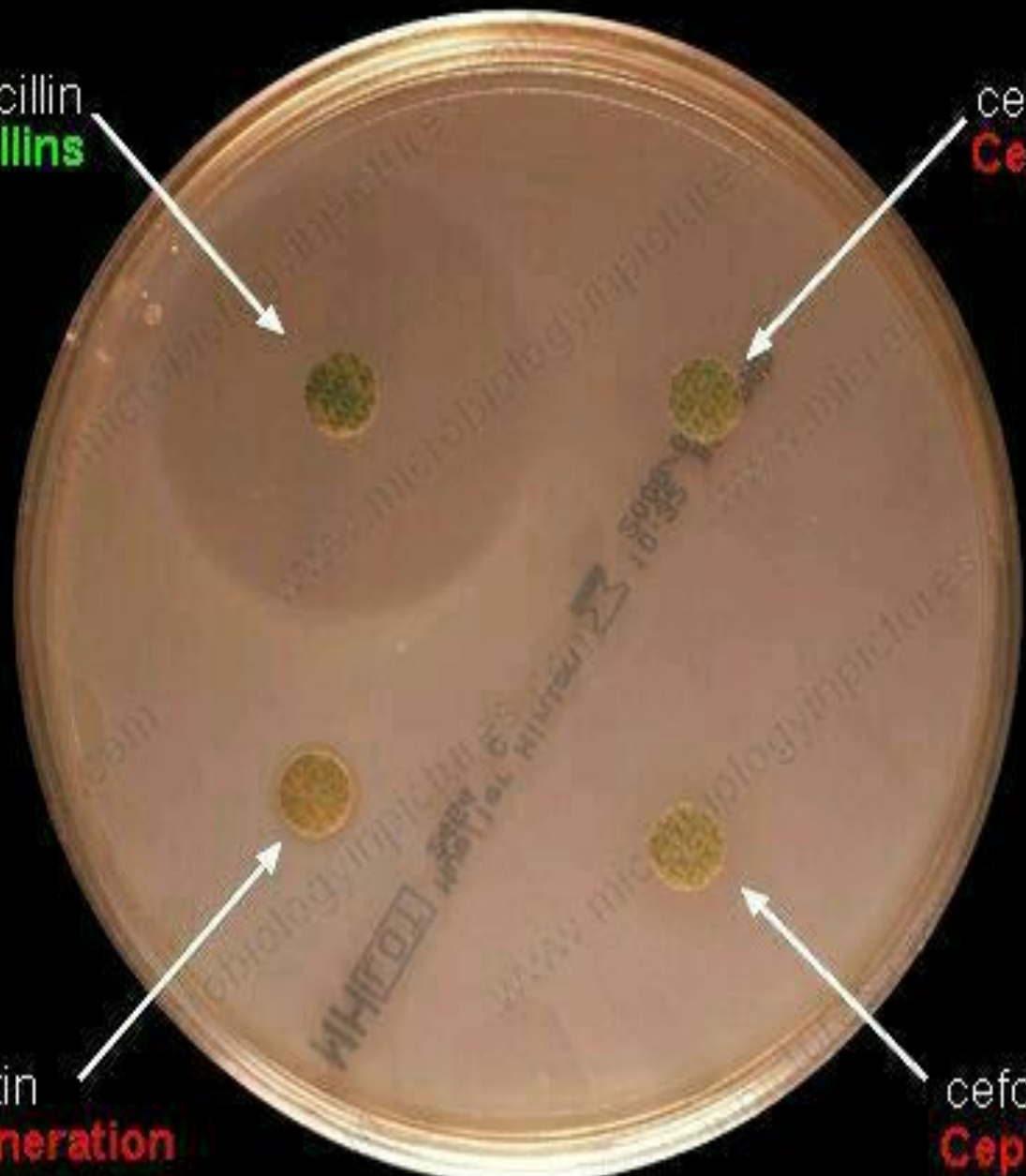
- اگر لیستریا مونوسیتوزنز را در محیط حرکت (یک محیط نیمه جامد) کشت دهیم و در حرارت قرار دهیم بعد از 1-3 روز به دلیل اینکه تحرک لیستریا در فشار کم اکسیژن بیشتر می شود اما در فقدان اکسیژن حرکت نمی کند منظره چتر (umbrella) ایجاد می گردد.

حرکت غلیدن (End to end tumbling) (motility)

- اگر لیستریا مونوسیٹوزنز را در نوترینت برات و در حرارت اتاق 1-2 h انکوبه نمایند. دارای 4 فلاژل پری تریکوس شده و متحرک می گردد.
- اگر از چنین محیطی wet mount تهیه کنیم و با بزرگنمایی 10×40 مشاهده کنیم حرکت مخصوص باکتری به صورت Tumbling motility (غلیدن) مشاهده می گردد.
- در حرارت 37°C باکتری دارای یک فلاژل می باشد و بی حرکت است

amoxicillin
penicillins

cefuroxime
Ceph. II. generation



cefoxitin
Ceph. II. generation

cefotaxime
Ceph. III. generation

CAMP	Positive (+ve)
Catalase	Positive (+ve)
Flagella	Flagellated
Gas	Negative (-ve)
Gram Staining	Positive (+ve)
H ₂ S	Negative (-ve)
Hemolysis	Beta Hemolysis
Indole	Negative (-ve)
Motility	Motile
MR (Methyl Red)	Positive (+ve)
Nitrate Reduction	Negative (-ve)
Oxidase	Negative (-ve)
Shape	Rods
Spore	Non-Sporing
Urease	Negative (-ve)

