



دانشگاه اصفهان

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

شناسایی کلوستریدیوم (CLOSTRIDIUM)

Classification:
Domain: Bacteria
Division: Firmicutes
Class: Clostridia
Order: Clostridiales
Family: Clostridiaceae
Genus: Clostridium

Clostridium

- Examples
 - *C. tetani*
 - *C. perfringens*
 - *C. botulinum*
- Characteristics
 - GPR
 - Obligate anaerobes
 - Motile
 - Spore former (terminal)
 - Exotoxins



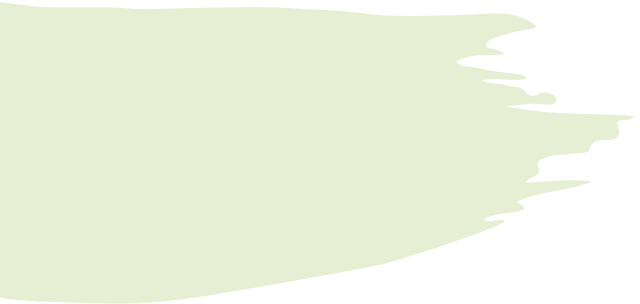
باکتری های گرم مثبت اسپوردار هستند و در شاخه ی فرمیکوتس قرار دارند. این جنس بیش از ۱۰۰ گونه دارد که حدود ۳۰ گونه ی آنها برای انسان پاتوژن است. تقریبا همه باسیل بی هوازی اسپوردار اغلب به عنوان کلستریدیوم طبقه بندی میشوند. گونه های کلستریدیوم باعث کزاز بوتولیسم گانگرن گاز یا میونکروز، سپتی سمی، عفونت های بافت نرم در بالا و پایین کمر آپاندیسیت پریتونیت کولیت کاذب مواد غذایی مسمومیت و سایر عفونت های شکمی می شوند.

- به طور کلی مشخصات کلستریدیوم ها این گونه است باسیل گرم مثبت - اسپوردار - بی هوازی اما
- برخی گونه ها ممکن است گرم متغیر باشند انجام رنگ آمیزی گرم در شرایط بی هوازی نتیجه آن را بهبود می بخشد.
- برخی به راحتی اسپور تشکیل میدهند و برخی فقط در شرایط بسیار سخت تولید اسپور دارند. به طوری که ممکن است در نمونه بالینی و حتی در پلیت های آگار اسپور مشاهده نشود. به عنوان مثال کلستریدیوم پرفرینژنز (*C. perfringens*) در شرایط بسیار سخت تولید اسپور می کند.
- برخی بی هوازی مطلق و برخی تحمل کننده ی هوا (آئروتولرنت) هستند. از گونه های آئروتولرنت می توان به *C. septicum* (سپتیکوم) *C. histolyticum* (هیستولیتیکوم) *C. perfringens* (پرفرینژنز). تست کاتالاز با استفاده از آب اکسیژنه ۱۵ درصد برای تمایز گونه های آئوتولرنت کلستریدیوم و باسیلوس استفاده می شود. باسیلوس ها اغلب بسیار کاتالاز مثبت هستند اما کلستریدیوم ها در این تست کاتالاز منفی اند یا به صورت ضعیف کاتالاز مثبت می باشند.
- اغلب متحرک هستند و معمولاً فلاژل پری تریش دارند.

تفاوت باسیلوس ها با کلستریدیوم ها

1. باسیلوس ها هوازی و کاتالاز مثبت ولی
کلستریدیوم ها بی هوازی و کاتالاز منفی
هستند.

2. در باسیلوس ها اسپور معمولا باعث تورم
سلول نمیشود ولی در کلستریدیوم ها اغلب
اسپور سلول مادری را متورم میکند.



اسپور اغلب کلستریدیوم ها اغلب بیضوی و نزدیک به انتهاست اما فرمهای دیگر هم ممکن است دیده شود. با توجه به این که بی هوازی هستند باید برای کشت آنها از جار بی هوازی و گازیک استفاده کنیم به منظور کشت بی هوازی میتوانیم از محیط تیو گلیکولات هم استفاده کنیم ماده ی تیوگلیکولات یک ماده ی احیا کننده است که با اکسیژن محیط واکنش میدهد. برای تشخیص اینکه آیا اکسیژن مصرف شده یا نه میتوان از معرف رزازورین یا متیلن بلو استفاده کرد. اگر متیلن بلو استفاده کنیم در بالای لوله که در تماس با هواست رنگ آبی و اگر از معرف رزازورین استفاده کنیم بالای لوله صورتی میشود.

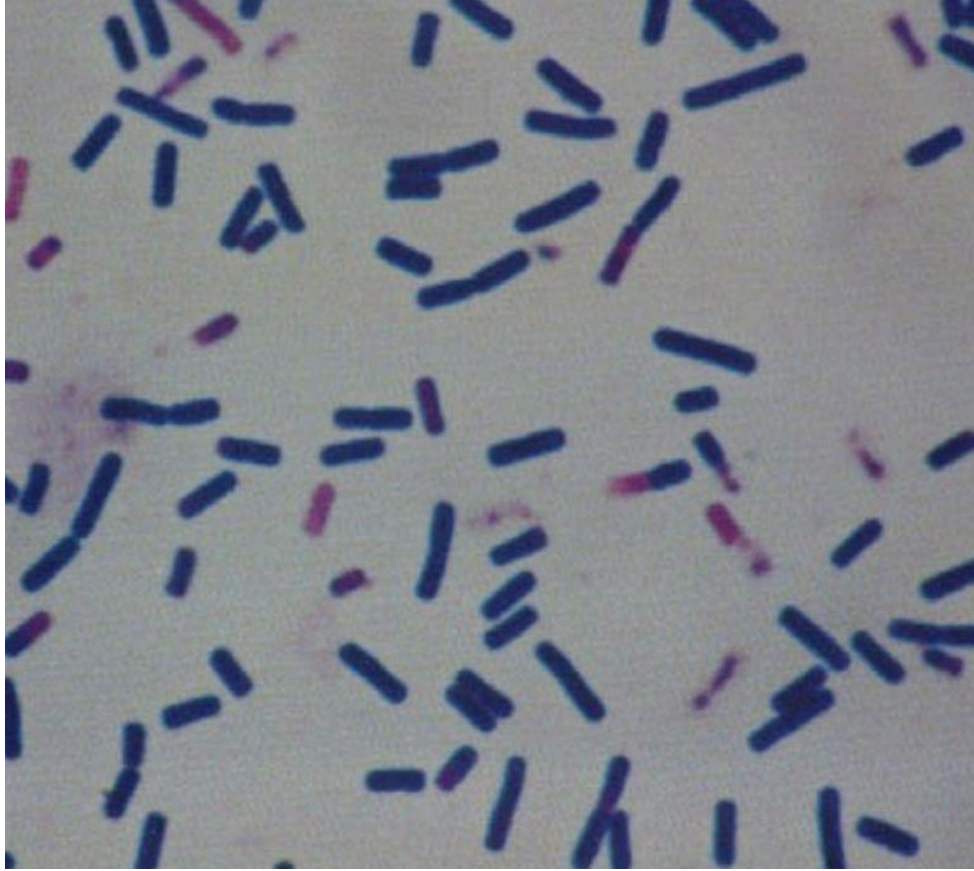
روش جداسازی کلستریدیوم ها

کلستریدیوم بی هوازی است برای جداسازی از عمق خاک نمونه برداری میکنیم ولی برای باسیلوس ها نمونه برداری از خاک های سطحی انجام میشود چون اسپور کلستریدیوم مقاوم به حرارت است برای جداسازی از شوک حرارتی استفاده میکنیم. ابتدا خاک را در آب مقطر یا سالین استریل به میزان ۱ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه قرار میدهیم سپس ۱ میلی لیتر از آن را به محیط **cooked meat** یا تیوگلیکولات تلقیح میکنیم. می توان همچنین از محیط **TSB** استفاده کرد و بعد از تلقیح باکتری روی محیط پارافین ریخت که شرایط بی هوازی فراهم شود. بعد از انکوباسیون از این محیط مایع روی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت کشت میدهیم و آنرا در جار بی هوازی قرار میدهیم از کلونی های رشد یافته چند مورد را انتخاب و رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز آنها را بررسی می کنیم. در صورتی که باسیل گرم مثبت کاتالاز منفی بود میتوان کلونی مربوطه را روی پلیت دیگر خالص سازی کرد تا بتوان از کلنی خالص شده آن برای انجام تستهای بیوشیمیایی و شناسایی گونه استفاده کرد. از آن جایی که کند رشد هستند زمان انکوباسیون باید ۴-۵ روز باشد.

شناسایی کلستریدیوم پرفرینژنز (C.Prefrigens)

کلستریدیوم پرفرینژنز ساکن روده بزرگ و از جمله گونه های است که اغلب از نمونه های بالینی جداسازی می شود. این باکتری شایعترین عامل گانگرن گاز است. اگر چه دیگر کلستریدیوم ها نیز میتوانند این بیماری را ایجاد کنند. گانگرن گازی باعث تخریب سریع موضعی عضلات و بافت نرم با علائم سیستمیک مسمومیت و افت فشار خون است. تشخیص زودهنگام بیماری برای جلوگیری از پیشرفت بیماری که اغلب با قطع عضو و جلوگیری از عفونت بیشتر همراه است. بسیار مهم می باشد. پیدا کردن کلستریدیوم پرفرینژنز در نمونه بالینی به منزله یک اورژانس پزشکی است و پزشک باید فوراً اطلاع داده شود (برای مثال از ظاهر گرم رنگ آمیزی گونه کلستریدیوم در اگزودای التهابی)، علاوه بر نقش آن در گانگرن گازی کلستریدیوم پرفرینژنز یکی از شایع ترین علل مسمومیت غذایی است. مسمومیت کلستریدیوم پرفرینژنز توسط سوش های تولید کننده انتروتوکسین ایجاد می شود. سلول های کلستریدیوم پرفرینژنس باسیل گرم مثبت و یا گرم متغیر بزرگ شبیه واگن قطار با انتهای ضخیم اند که به تنهایی یا به صورت جفتی آرایش می یابند. اسپور معمولاً یا در داخل بدن و یا در شرایط آزمایشگاهی دیده نمی شود، اما زمانی که اسپور تولید کند اسپورها بزرگ بیضوی و نزدیک به انتها (ساب ترمینال) هستند و باعث تورم سلول مادری میشوند .

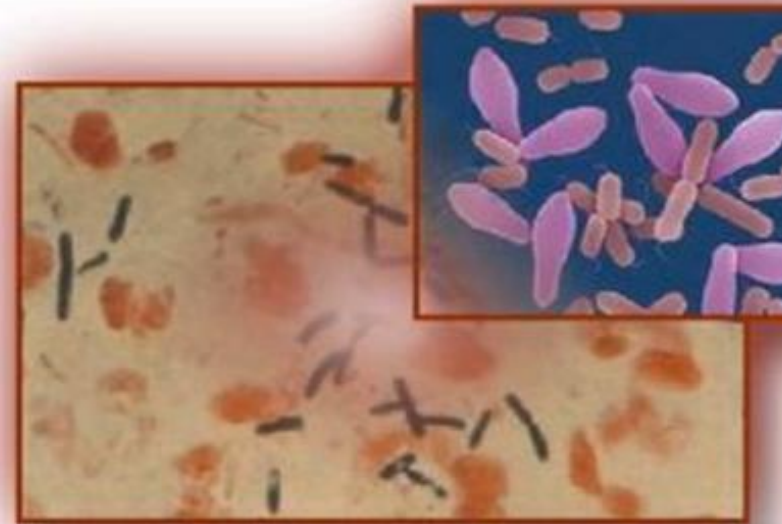
بر روی محیط بلاداآگار کلونی های بزرگ نامنظم و خاکستری تولید میکند که معمولا با همولیز دوگانه (double zone of hemolysis) احاطه شده است. در این نوع همولیز ناحیه داخلی دارای همولیز کامل و ناحیه خارجی دارای همولیز ناقص است. قرار دادن پلیتهای در یخچال به مدت ۱ تا ۲ ساعت همولیز را بهبود می بخشد کلستریدیوم پرفرینژنس سریع الرشد ترین گونه کلستریدیوم است. این باکتری لستیناز مثبت و لیپاز منفی است. همچنین کلستریدیوم پرفرینژنس در محیط لیتموس میلک واکنش تخمیر طوفانی ایجاد می کند.



کلستریدیوم پرفرینژنز

C. perfringens

- Membrane disrupting toxin (phospholipids)
 - Alpha toxin (lecithinase)
 - Rupture RBCs
 - Destroy Tissue
- Enzymes
 - Collagenase
 - Hyaluronidase
 - DNase
 - CH₂O fermentation → Gas
- Exposure
 - Puncture wounds, fractures
 - Surgical
 - Contaminated food
- Diseases
 - Food poisoning
 - Improper cooking
 - V/D
 - Gas gangrene
 - Anaerobic cellulitis
 - myonecrosis



Gas Gangrene



Clean wound



Gangrenous wound



© ADAM, Inc.

Treatment

Debride

AB

Hyperbaric O₂

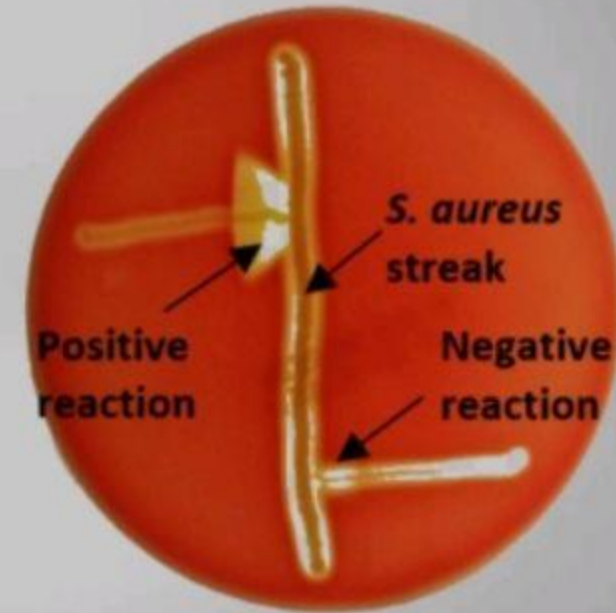
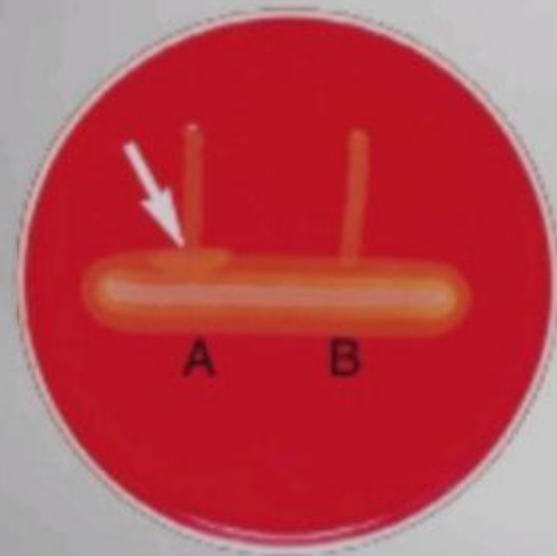


تست

Reverse CAMP

تست CAMP معکوس برای شناسایی کلستریدیوم پرفرینژنس از دیگر گونه های کلستریدیوم استفاده می شود. در این تست باکتری CAMP مثبت استرپتوکوکوس آگالاکتیه در مرکز بلاداگار به صورت خطی کشت داده می شود. سپس کلستریدیوم پرفرینژنس عمود بر این خط طوری که آن را قطع نکند کشت داده میشود. محیط بلاداگار در شرایط بی هوازی و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه می شود در نتیجه میانکنش سینرژسمی آلفا توکسین کلستریدیوم پرفرینژنس و فاکتور CAMP استرپتوکوکوس آگالاکتیه در حد فاصل خط کشت دو باکتری همولیز نوک پیکانی شکل ، دیده می شود.

Christie-Atkins-Munch-Peterson test (CAMP)

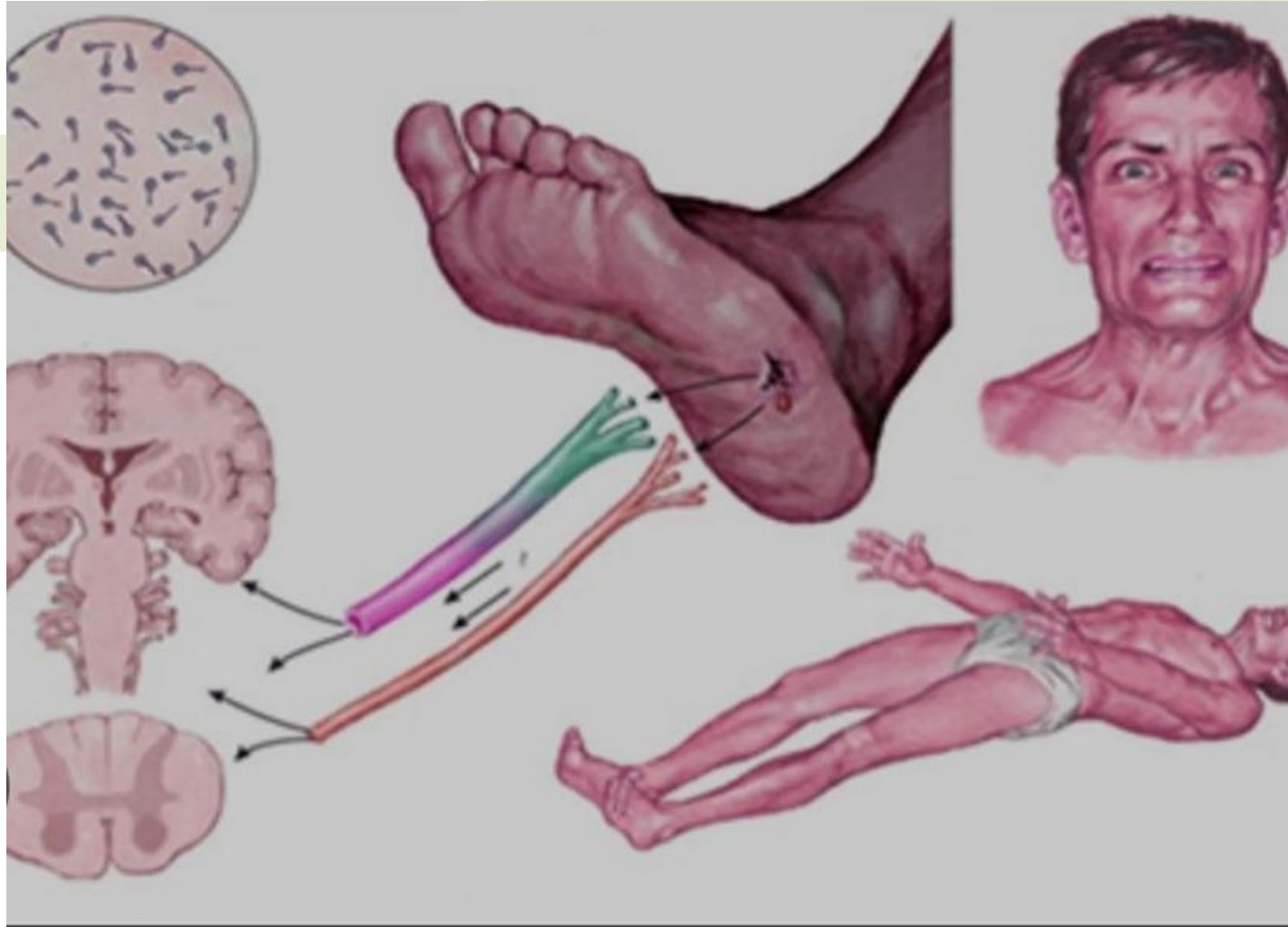


شناسایی کلستریدیوم تتانی (C.Tetanii)

این باکتری عامل بیماری کزاز است. این باکتری نورو توکسین تولید میکند که مانع از ریلکس شدن عضلات منقبض شده میشود. در واقع یک فلج انقباضی ایجاد میکند ابتدا فک بیمار قفل میشود بعد عضلات صورت اسپاسم میشود و یک حالت خنده در صورت ایجاد میشود (خنده ی تمسخر آمیز) بعد از آن ماهیچه های تنفسی در گیر میشوند و به دلیل توقف تنفس فرد میمیرد. ممکن است عضلات کمر هم دچار انقباض شده و یک حالت قوس در کمر ایجاد شود. در بیشتر کلستریدیوم ها، فاکتور ویرو لانس، توکسین است. کلستریدیوم تتانی باسیل گرم مثبت بلند و باریک با آرایش تکی با جفتی است تشکیل اسپورهایی که باعث تورم سلول مادری می شوند در انتهای سلول به آنها ظاهری همچون راکت تنیس میدهد. بعد از ۲۴ ساعت از انکوباسیون یا زمانی که اسپورولاسیون رخ دهد سلولها گرم منفی رنگ میگیرند. کلستریدیوم تتانی متحرک است. کلونی های این باکتری بر روی یلاد آگار قطری حدود ۴ تا ۶ میلی متر داشته مسطح نامنظم و خاکستری اند و معمولا ناحیه باریکی از همولیز بتا اطراف کلونی آنها مشاهده می شود. اغلب کلونی کلستریدیوم تتانی بر سطح یک پلیت آگار مرطوب سوارم نازک دارد.



کلستریدیوم تتانی



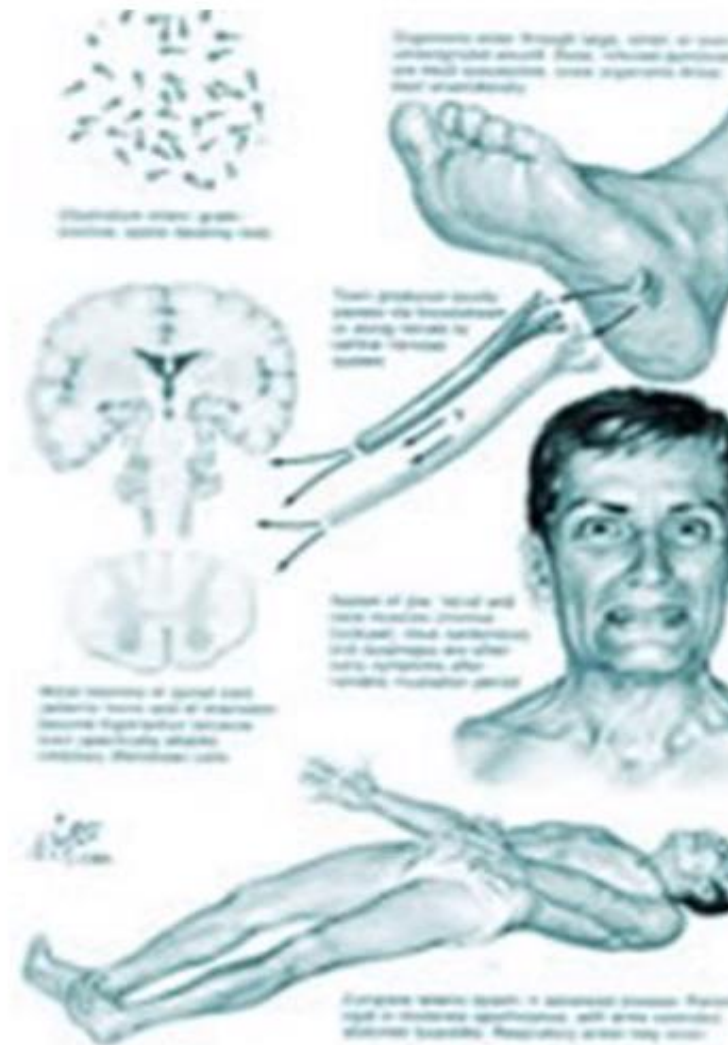
C. tetani

- Epidemiology: saprophyte
 - Soil
 - Dust
 - GI tract
 - Wounds (deep)
 - Burns
 - Umbilical stump
 - Animal bites
- A-B neurotoxin (exotoxin)
 - Tetanospasm
 - Blocks release of inhibitory NT
 - Glycine
 - Relaxes opposing muscle
 - Without: both muscle groups contract
- Tonic Spasms
 - Localized (Lockjaw)
 - Cephalic
 - Generalized
 - Death → respiratory failure



C. tetani

- Dx
 - Spores in wound
 - Blood toxin levels
 - Toxin neutralization test
- Treatment
 - Antitoxin (HTIg)
 - AB
 - Debride
 - Curare poison
 - paralysis
 - ventilator
- Prevention
 - Vaccination
 - Toxoid (DPT)
 - Antitoxin



شناسایی کلستریدیوم بوتولینوم (C. Botulinum)

این باکتری عامل بوتولیسم است . بوتولیسم یک مسمومیت غذایی شدید است . این باکتری نوروتوکسین را ایجاد میکند که برخلاف نوروتوکسین کلستریدیوم تتانی عضلات را شل میکند . این نوع فلج هم نیز میتواند منجر به ایست تنفسی شود. چندین نوع بوتولیسم وجود دارد، بوتولیسم نوزادی بوتولیسم زخم و بوتولیسم غذایی در دو مورد اول اسپور باکتری وارد بدن میشود و در نوع غذایی توکسین وارد بدن میشود.

کلستریدیوم بوتولینوم یک باسیل گرم متغیر است. سلول ها در کشت های جوان معمولا گرم مثبت اند، اما سلول در کشت های مسن تر از ۱۸ ساعت معمولا گرم منفی رنگ میگیرند. کلستریدیوم بوتولینوم تولید اسپور نزدیک به انتها می کند. مورفولوژی کلونی کلستریدیوم بوتولینوم بسته به نوع توکسینی که تولید میکند متفاوت است کلونی ها ممکن است برآمده یا مسطح صاف و یا خشن باشند. در محیط (EYA) egg yolk agar آنها معمولا سطح قوس قزحی را نشان می دهند که در نتیجه لیپاز مثبت بودن باکتری است. تشخیص بوتولیسم اصولا بر اساس نشانه ها و علائم بیماری است. آزمایش های تایید بوتولیسم معمولا در آزمایشگاه بهداشت عمومی مرجع با استفاده از شامل کشف توکسین آن در سرم، مدفوع، محتویات معده ، استفراغ و غذا و بررسی سمیت آن با آزمایش در موش و یا جداسازی کلستریدیوم بوتولینوم از نمونه مدفوع انجام می شود.

C. botulinum

- Location
 - Soil
 - Water
 - Improper canning
 - GI tracts of animals
- Epidemiology
 - Intoxication
 - Food borne
 - Toxin (canned food)
 - Infant
 - Ingestion of endospores
 - Source: honey
 - Wound
 - endospores

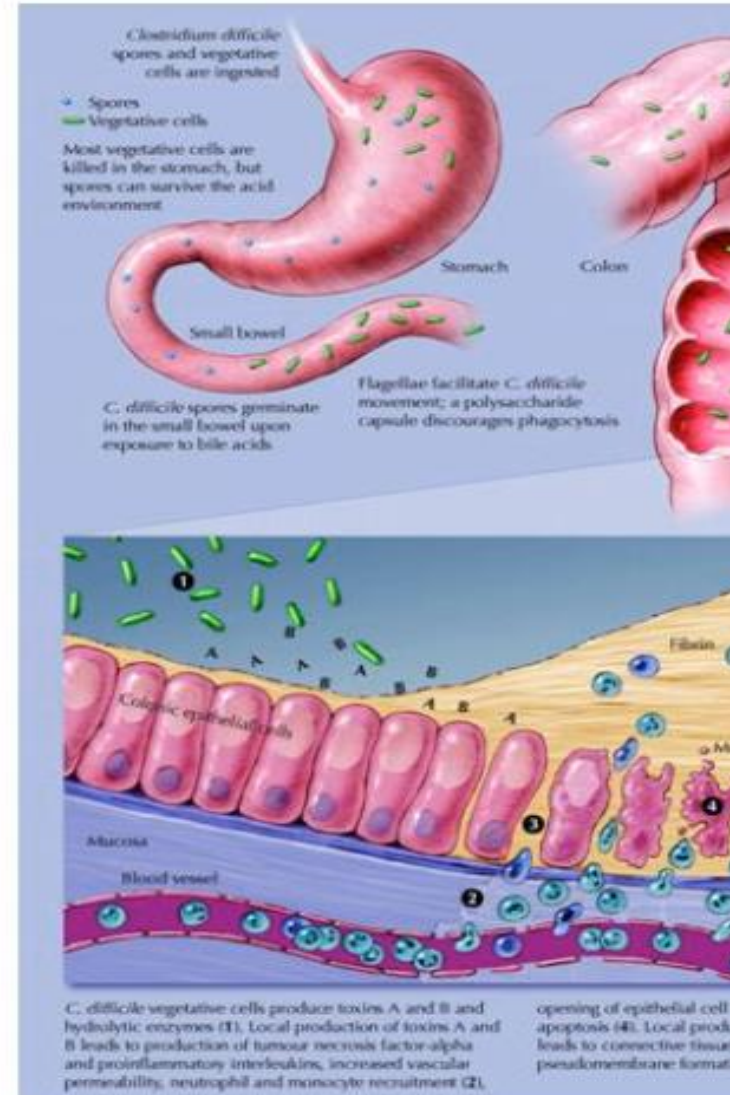


شناسایی کلستریدیوم دیفیسیل (C.difficil)

کلستریدیوم دیفیسیل شایع ترین عامل اسهال مرتبط با آنتی بیوتیک و کولیت التهاب روده بزرگ با غشای کاذب است. این باکتری به عنوان بخشی از دستگاہ گوارش یافت میشود. سلول های کلستریدیوم دیفیسیل باسیل بزرگ مستقیم اند که ممکن است زنجیره متشکل از ۲ تا ۶ سلول تولید کنند اسپور بیضوی و نزدیک به انتهای آن باعث تورم سلول مادری می شود. کلستریدیوم دیفیسیل متحرک است. از نظر مورفولوژی کلونی در بلاد آگار کلونی ها قطری حدود ۲ تا ۵ میلیمتر داشته مسطح با کمی برآمده خاکستری یا سفید و غیرهمولیتیک هستند.

Clostridium difficile

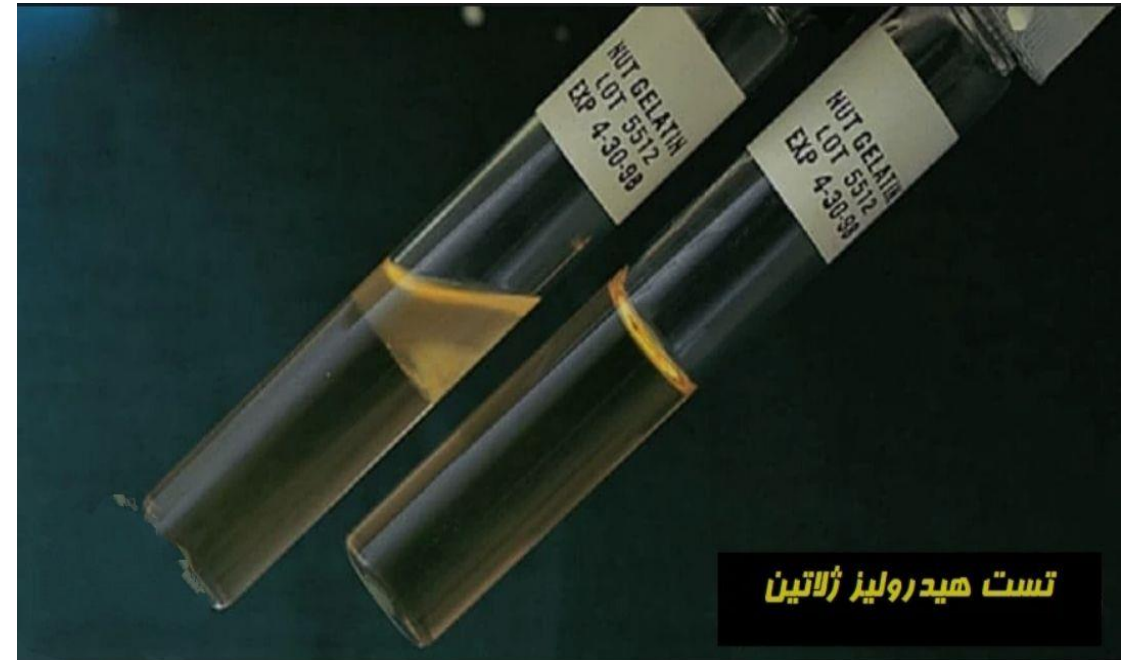
- GI source
- Epidemiology
 - Long term care facilities
 - Chronic AB use
 - Fecal-oral route
- Pathogenicity
 - Toxins
 - Spores
- Diseases
 - Colitis pseudomembrane
 - Cecal perforation = fatal



این تست های برای شناسایی گونه های کلستریدیوم به کار می روند

- رشد در ۳۷ درجه
- استفاده از کربوهیدرات ها مثل گلوکز لاکتوز سوکروز سالیسین برخی از کلستریدیوم ها ساکارولیتیک و برخی پروتئولیتیک هستند.
- احیای نیتрат
- ژلاتیناز
- کازئیناز
- اوره از
- بررسی فعالیت لیپازی تشکیل هاله ی شفاف و همچنین فعالیت لستینازی در محیط Egg yolk agar
- رشد روی بلاد آگار کلستریدیوم ها همولیزهای مختلفی روی این محیط دارند
- C.botulinum همولیز آلفا
- C.tetanii همولیز بتا
- C.prefrigens همولیز دوگانه یعنی در اطراف کلنی هر دو نوع همولیز دیده میشود

تست ژلاتیناز



فعالیت لستینازی در
egg yolk agar



تست Egg yolk

Table 6.1. First-stage table for Gram-positive bacteria

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Shape	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acid fast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+
Spores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	D	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-	-	D	D	-	-	-	-
Growth in air	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	d	+	+	+	+	+
Growth anaerobically†	-	+	w	w	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	D	-	-	?
Catalase	+	+	w	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	?	d	-	-	-	-
Glucose (acid)	D	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	D	D	+	+	+	+
Carbohydrates [F/O/-]	O/-	F	F	F	F	F	F/-	-	-	F	F/-	F	F	F	F	-	F/-	F/O/-	O	O	O/NT	O/NT
<i>Micrococcus</i> ^a	+	+																				
<i>Staphylococcus</i>	+	+																				
<i>Aerococcus</i>			+	+																		
<i>Enterococcus</i>					+																	
<i>Streptococcus</i>						+																
<i>Lactococcus</i>							+															
<i>Pediococcus</i> ^b								+														
<i>Gemella</i>									+													
<i>Anaerobic cocci</i> [*]										+												
<i>Kurthia</i>											+											
<i>Corynebacterium</i>												+										
<i>Listeria</i>													+									
<i>Brochothrix</i>														+								
<i>Erysipelothrix</i>															+							
<i>Lactobacillus</i>																+						
<i>Arcanobacterium</i>																	+					
<i>Arachnia</i> ^c																		+				
<i>Rothia</i>																			+			
<i>Propionibacterium</i>																				+		
<i>Actinomyces</i>																					+	
<i>Bifidobacterium</i>																						+
<i>Eubacterium</i>																						+
<i>Clostridium</i> ^d																						+
<i>Bacillus</i>																						+
<i>Nocardia</i> ^e																						+
<i>Mycobacterium</i>																						+

- * *Peptococcus* and *Peptostreptococcus*.
 - a Also *Stomatococcus*.
 - b Also *Leuconostoc*.
 - c Also *Actinomyces odontolyticus*.
 - d Exceptions: *C. histolyticum*; *C. tertium*; *C. carnis*.
 - e Also *Actinomadura*.
 - † Anaerobic growth of anaerobes inhibited by metronidazole.
 - D Different reactions in different species of the genus.
 - d Different reactions in different strains.
 - F Fermentation.
 - O Oxidation.
 - w Weak reaction.
 - ? Not known.
 - ⊖ Asporogenous variants.
 - ⊕ Typical form.
- Cultural characters of these organisms can be found in tables with the number indicated.
- S Sphere (coccus).
 - R Rod-shaped (bacillus).
 - NT Not testable.

Other symbols used in the table are explained in Tables 5.1 and 5.2 on p. 47.

Table 6.8. Second-stage table for Clostridium

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Motility	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D
Spore position and shape	UX	UX	UX	TX	VX	VX	TX	TX	VX	VX	VY	UX	UX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	TY	VX	VX	-
Growth at 37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Carbohydrates, acid from:																							
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	D
lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
sucrose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	d ^a	d ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
salicin	+	-	+	+	-	+	+	+	-	d ^a	d ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
Nitrates reduced	-	d ^a	+	+	-	-	-	-	d ^a	d ^a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	D
Gelatinase	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	d ^a	+	+	+	-	D
Caseinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	+	d	-	-	-	+	-	?
Egg yolk:																							
lecithinase C	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	D
lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

1 *Clostridium butyricum*

2 *Clostridium perfringens*;
Welchia perfringens '*C. welchii*'

3 *Clostridium barati*; *C. parapaperfringens*

4 *Clostridium tertium*

5 *Clostridium fallax*

6 *Clostridium carnis*

7 *Clostridium ramosum*

8 *Clostridium innocuum*

9 *Clostridium chauvoei*; *C. fesseri*

10 *Clostridium septicum*

11 *Clostridium sphenoides*

12 *Clostridium botulinum* (A,B,F)*

13 *Clostridium botulinum* (C,D,E)†

14 *Clostridium novyi*; *C. oedematiens*

15 *Clostridium bifermentans*

16 *Clostridium sordelli*; *C. bifermentans*

17 *Clostridium sporogenes* تهیه

18 *Clostridium difficile*

19 *Clostridium subterminale*

20 *Clostridium tetani*; *Plectridium tetani*

21 *Clostridium histolyticum*

22 *Clostridium putrefaciens*

23 *Eubacterium* spp.



با سپاس از توجه شما
در ستم من! یار من

تهیه کننده : سهیلا عباسی