مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۶ ، پاییز ۱۳۹۰، صفحات۴۲-۳۸

رائه روشی جهت ارزیابی صحت عملکرد کیت تشخیص آنتروباکتریاسه[۱]

احمد همایون[۲] ، پریسا مرسلی،

۱. دانشگاه صنعتی اصفهان
۲. دانشگاه علوم پزشکی ارتش
۳. کارشناسی ارشد مهندسی مکانیک دانشکده پیراپزشکی
ahmadhomayoon@gmail.com
۰۹۱۳۲۸۹۲۷۱۲
morsalli n55@ahoo.com
۰۹۱۲۵۸۶۶۹۳۹

چکیده:

یکی از مهمترین گروه های باکتری گرم منفی، خانواده آنتروباکتریاسه است که بمنظور تشخیص آن از روش های مختلفی نظیر تست های لوله ای و همچنین روش های نوین آزمایشگاهی این امر محقق می‌شود. با این وجود، با توجه به مشکلات روش های سنتی کشت لوله ای همچون هزینه نیروی انسانی، مالی و زمانی برای آماده‌سازی محیط کشت، آلودگی های میکروبی، دشواری ساخت محیط های کشت مختلف و ...، استفاده از روش های نوین آزمایشگاهی مورد توجه محققان قرار گرفته است. یکی از مهمترین روش های رایج، استفاده از روش مینی ویال های حاوی محیط کشت برای تشخیص آنتروباکتریاسه است. روش مینی ویال های حاوی محیط کشت، از ۱۰ تست حاوی محیط کشت خشک شده ساخته شده است.

هدف از پژوهش حاضر، ارائه روشی برای ارزیابی عملکرد کیت تشخیص آنتروباکتریاسه و بررسی صحت نتایج کیت ساخته شده است. بدین منظور از ٤ سویه میکروبی شامل انتروباکتر کلاسه، کلبسیلا پنمونیه، اشریشیاکلای، پروتئوس ولکریس استفاده شده است که قابلیت ارزیابی کلیه تست ها را فراهم می کند. بر این اساس، سوسپانسیونی از میکروب مورد نظر ساخته شده، و در مینی ویال های کیت تلقیح می‌شود. پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون، نتایج هر یک از تست ها با جدول راهنما مقایسه شده است. آزمایشات بعمل آمده نشان می‌دهد که نتایج کلیه تست ها با دقت بسیار خوبی با جداول مرجع انطباق دارد.

واژگان کلیدی: باکتری های گرم منفی – آنتروباکتریاسه – کیت تشخیص آنتروباکتریاسه

---

[۱] مقاله با همکاری کلیه مولفین تهیه، خوانده و تایید شده است. تاریخ ارسال مقاله: ۱۳۸۹/٦/۲۲

[۲] مولف رابط

مقدمه:

با توسعه سریع و فزاینده علوم جرم شناسی، پزشکی، بیوتکنولوژی و موضوعات زیست محیطی، نیاز به انجام آزمایش‌های تشخیصی روز به روز افزایش می‌یابد. از جمله مهمترین آزمایشهای بیوشیمی که در تشخیص نوع باکتری‌های نمونه‌ی بیمار استفاده می‌شود، تست تشخیصی آنتروباکتریاسه[1] است که ۷۸ درصد از باکتری های جدا شده از نمونه های بیمارستانی را تشکیل می‌دهد [۱]. خانواده آنتروباکتریاسه بوسیله صفات بیوشیمیایی مختلفی نظیر قابلیت احیا نیترات و تولید نیتریت، تخمیر گلوکز و ایجاد اسید با گاز یا بدون گاز، تست اکسیداز منفی و عدم نیاز به وجود مقادیر فراوان کلرور سدیم برای رشد و داشتن دنباله بصورت پری تریش مشخص می‌شوند [۲].

در روش سنتی تشخیص آنتروباکتریاسه، نمونه آنتروباکتریاسه را در لوله‌های آزمایشگاهی حاوی محیط کشت اضافه می‌کنند و با توجه به نتایج آزمایشات، گونه آنتروباکتریاسه را تعیین می‌کنند. از جمله معایب روش تست لوله ای تشخیص آنتروباکتریاسه، نیاز به مواد شیمیایی اولیه برای کلیه کشت‌ها و سرمایه راکد فراوان است. همچنین میزان مصرف محیط کشت در تست های لوله‌ای بسیار بیشتر از کیت‌های آماده آنتروباکتریاسه است. از دیگر معایب روش لوله‌ای، هزینه نیروی انسانی و زمان مورد نیاز برای آماده‌سازی محیط کشت است. مجموعه موارد فوق الذکر باعث شده است که در عمل، عموما آزمایشگاه ها کشت لوله‌ای آنتروباکتریاسه را محدود به چند کشت خاص کنند و تعیین گونه و نوع آنتروباکتریاسه با حدس و گمان صورت می‌پذیرد.

امروزه روش های سریع تشخیصی در غالب کیت های تشخیص سریع[2] بدلیل سهولت و افزایش دقت و سرعت آزمایش‌ها مورد توجه محققان علوم آزمایشگاهی قرار گرفته است. این روش‌ها در زمان نسبتا کوتاهتر و با هزینه‌های کمتر، انجام پذیر هستند [۳]. در دهه‌های اخیر، درخصوص تشخیص آنتروباکتریاسه روش هایی همچون کیت آنتروباکتریاسه به روش مینی ویال های حاوی محیط کشت ارایه شده است که در سرتاسر دنیا مقبولیت بسیار خوبی کسب کرده است. در این روش با اضافه کردن سوسپانسیون باکتری خالص به مینی ویال ها و قرار دادن آن در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت، واکنش های رنگی در تست های مختلف صورت می‌پذیرد که با توجه به جدول راهنما، می‌توان نوع باکتری را تعیین نمود [۴]. کیت آنتروباکتریاسه این امکان را فراهم می‌سازد تا علاوه بر تعیین جنس‌های اصلی آنتروباکتریاسه، گونه‌های مختلف و زیر گروهای آن نیز بصورت دقیق شناسایی شود. هدف از پژوهش حاضر ارائه روشی جهت ارزیابی صحت عملکرد کیت ساخته شده و بررسی توانایی های این روش در تشخیص گونه های مختلف آنتروباکتریاسه است.

روش بررسی:

بمنظور اطمینان از صحت نتایج کیت تشخیص آنتروباکتریاسه، می بایست عملکرد هر یک از تست ها بر روی باکتری های شناخته شده ارزیابی شود. در صورتیکه نتایج تست ها با نتایج جداول مرجع انطباق داشته باشد، می توان از صحت عملکرد کیت اطمینان پیدا نمود [۵]. لیکن با توجه به گستره گونه های آنتروباکتریاسه، انجام تست بر روی همه گونه های خانواده آنتروباکتریاسه میسر نمی باشد. در پژوهش حاضر، با انتخاب چهار سویه خالص میکروبی و انجام آزمایش بر روی آنها، روشی برای صحت سنجی کیت تشخیص آنتروباکتریاسه ارائه شده است. باکتری هایی که بر روی آن ها تست صورت گرفته، شامل Enterobacter Cloacae (ATCC13047)، Proteus vulgaris (PTCC1076)، Klebsiella pneumoniace (ATCC 35657) و Escherichia coli (ATCC 25922) می باشد.

بمنظور کار با کیت نشخیص آنتروباکتریاسه، پس از کشت نمونه باکتری، سوسپانسیونی از میکروب خالص مورد نظر تهیه می‌شود. بدین منظور، یک یا دو کلنی از باکتری را در ۳ تا ۴ میلی لیتر سرم فیزیولوژی (۸/۵ گرم نمک در ۱ لیتر

---

[1] Enterobacteriacae

[2] Rapid Test

آب مقطر) تلقیح نموده و رقتی همانند ۱ مک فارلند با سرم فیزیولوژی استریل با PH مناسب ۵/۵ تا ۷ تهیه می شود[۶].

سپس کیت را در داخل یک پلیت و یا یک ظرف مناسب که مانع از تبخیر محتویات کیت شود، قرار داده می‌شود. سوسپانسیون میکروبی را در داخل مینی ویال ها تزریق می شود. لازم بذکر است که مقدار سوسپانسیون اضافه شده به کیت برای تست های مختلف متفاوت است. ویال هایی که نوشته آن در داخل کادر قرار دارد، یعنی تست های CIT و VP می‌بایست بطورکامل از سوسپانسیون پر شوند. سایر ویال ها فقط تا قسمت استوانه ای شکل هر ویال از سوسپانسیون پر می‌شوند. در ویال هایی که زیر آنها خط کشیده شده است، پس از ریختن سوسپانسیون میکروبی، باقیمانده حجم ویال با پارافین مایع استریل پر می‌شود، بنحوی که سوسپانسیون میکروبی با هوا در تماس نباشد. تست هایی که با پارافین پر می‌شوند، شامل تست های URE، H2S، ODC، LDC، ADH می‌باشد که برای سهولت کار می‌توان از یک سرنگ حاوی پارافین استریل استفاده نمود.

پس از تلقیح سوسپانسیون میکروبی، فرآیند انکوباسیون کیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت می‌پذیرد. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت، کیت را از انکوباتور خارج نموده و معرف های آنتروباکتریاسه، به تست ها اضافه می‌شود. با مقایسه نتایج حاصله با جدول (۱)، امکان تعیین نوع باکتری فراهم می آید.

جدول ۱: تغییر رنگ در تست های مختلف کیت آنتروباکتریاسه و ماده موثر هر تست

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
			NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-ßD-galactopyranoside	ß-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-ßD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
ADH	L-arginine	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
LDC	L-lysine	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
ODC	L-ornithine	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
CIT	trisodium citrate	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
H2S	sodium thiosulfate	H2S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
URE	urea	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DeAminase	TDA / immediate yellow	reddish brown
IND	L-tryptophane	INDole production	JAMES / immediate colorless pale green / yellow	pink
VP	sodium pyruvate	acetoin production (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min colorless	pink / red (5)

بررسی نتایج کیت تشخیص آنتروباکتریاسه:

نتایج تست کنترل کیفیت کیت های آنتروباکتریاسه، برای ۴ سویه آنتروباکتریاسه در جدول (۲) ملاحظه می‌شود. همانطورکه ملاحظه می‌شود، نتایج تست های صورت گرفته با نتایج مرجع انطباق کامل دارد و واکنش های صورت گرفته در کلیه تست ها صحیح می‌باشد. بمنظور اطمینان از عدم دخالت خطای انسانی در حین آزمایشات، برای هر گونه آنتروباکتریاسه، آزمایشات تکرار گردید و در همه موارد نتایج آزمایشات موید تست اولیه بوده است. در شکل (۱) و شکل (۲)، نتایج تست ها نشان داده شده

است. همانطورکه در شکل (۱) ملاحظه می‌شود، باکتری اشریشیا کلا، تست های ONPG، LDC، ODC و IND را مثبت نشان می‌دهد و صحت عملکرد این تست ها را نشان می‌دهد. در تست باکتری کلبسیلا، تست های ONPG، LDC، CIT و URE مثبت هستند و کارایی این تست ها نیز صحیح می‌باشد. لازم بذکر است که تست اوره در جدول شاخص متغیر (V) اعلام شده است که در شکل (۱)، مثبت شده است. همانطورکه در شکل (۲) مشاهده می‌شود، برای باکتری پروتئوس، تست های های CIT، H2S، URE، TDA و IND مثبت می‌باشد که با توجه به جدول مرجع، عملکرد این تست ها نیز مورد تایید می‌باشد. همچنین برای باکتری انتروباکتر، تست های ADH، ODC، CIT و VP مثبت می‌باشد که حاکی از صحت عملکرد این تست ها دارد. بنابر این کلیه تست های کیت آنتروباکتریاسه با استفاده از این ۴ سویه میکروبی مورد ارزیابی قرار می گیرد و در هر یک از تست ها حداقل ۱ و حداکثر ۳ جواب مثبت و منفی وجود دارد.

جدول ۲: نتایج تست های کیت آنتروباکتریاسه بر روی چهار سویه باکتری

Bio chemicals	Enterobacter cloacea ATCC 13047		Proteus Vulgaris PTCC 1079		Klebsiella peneumoniae ATCC 35657		Escherichia coli ATCC 25922	
	Test	Ref.	Test	Ref.	Test	Ref.	Test	Ref.
ONPG	+	+	-	-	+	+	+	+
ADH	+	+	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	+	+	+	+
ODC	+	+	-	-	-	-	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	-	-
H2S	-	-	+	+	-	-	-	-
URE	-	-	+	+	+	V	-	-
TDA	-	-	+	+	-	-	-	-
IND	-	-	+	+	-	-	+	+
Vp	+	+	-	-	-	V	-	-

شکل۱: نتایج تست کیت آنترویاکتریاسه – سمت راست: باکتری Escherichia coli – سمت چپ: Klebsiella pneumonia

شکل ۲: نتایج تست کیت آنترویاکتریاسه- سمت راست: باکتری Proteus vulgaris - سمت چپ:Enterobacter cloacae

نتیجه گیری:

پژوهش حاضر در خصوص روشی برای ارزیابی کیت تشخیص آنتروباکتریاسه می باشد. این کیت از ۱۰ تست حاوی محیط کشت خشک شده ساخته شده است که برای انجام آزمایش، با اضافه نمودن سوسپانسیون میکروبی، شرایط کشت میکروب ها فراهم می‌شود. بمنظور ارزیابی صحت عملکرد تست ها در کیت ساخته شده از ۴ نوع سویه میکروبی استفاده شده است. این سویه ها شامل انتروباکتر، کلبسیلا، اشریشیاکلا و پروتئوس است. با استفاده از سویه باکتری انتروباکتر، صحت عملکرد تست های ADH، ODC، CIT و VP اثبات گردید. همچنین در تست باکتری کلبسیلا ، نتایج تست های مورد تست های ONPG، LDC و CIT مورد ارزیابی قرار گرفته که با نتایج جداول مرجع انطباق داشته است. همچنین تست های ODC، H2S، URE و TDA برای سویه پروتئوس مثبت می‌باشد که با توجه به جدول مرجع، عملکرد این تست ها نیز مورد تایید می‌باشد. با انجام آزمایش بر روی باکتری اشریشیا کلای، تست های ONPG، LDC، ODC و IND مثبت می‌باشد که با نتایج جداول مرجع انطباق دارند. بنابر این کلیه تست های کیت آنتروباکتریاسه با استفاده از این سویه ها مورد ارزیابی قرار گرفته و صحت عملکرد این تست ها را نشان می‌دهد. از اینرو، این روش می‌تواند معیار مناسب و سریعی جهت تشخیص صحت کیت آنتروباکتریاسه باشد.

فهرست مراجع:

[1] Martin, S.M., Martin, W.J., Mosby, C.V., Louis, S., Finegold, M,. Diagnostic Microbiology, 1990.

[2] Willey, J., Sherwood, L. and Woolverton, C., Harley & Klein's Microbiology, 7th Edition. McGraw Hill, 2008.

[3] Hartman, P. A., Miniaturized microbiological methods, Academic Press Inc., New York. 1968.

[4] Weaver, R. H., Arnold, Jr. and J. Hannan. The development of quick microtechniques for the identification of cultures. J. Bacteriol. 51:565-566. 1946.

[5] Washington, J. A., Yu, P. K. W., and Martin, W. J. Evaluation of accuracy of multitest micromethod system for identification of Enterobacteriaceae. Appl. Microbiol. 22:267-269. 1971.

[6] Smith, P. B., Tomfohrde, K. M., Rhoden, D. L. and Balows, A., API System: a Multitube Micromethod for Identification of Enterobacteriaceae, Appl. Microbiol, 1972.