جداسازی و شناسایی گونه‌های جنس کمپیلوباکتر

بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۱-۹۶۶۱

اصول آزمون

- غنی سازی در محیط کشت مایع انتخابی
- جداسازی بر روی محیط کشت جامد انتخابی
- انجام آزمون‌های تأییدی

مواد مورد نیاز

- ❑ محیط کشت آبگوشت بولتون براث
- ❑ محیط کشت آبگوشت پرستون براث
- ❑ محیط کشت چارکوآل سفوپرازون داکسی کولات آگار اصلاح شده (mCCD)
- ❑ محیط کشت کلمبیا بلادآگار
- ❑ محیط کشت پرستون آگار یا کارمالی آگار یا اسکایرو آگار
- ❑ معرف آزمون اکسیداز
- ❑ معرف آزمون کاتالاز
- ❑ معرف آزمون هیدرولیز هیپورات
- ❑ معرف آزمون هیدرولیز ایندوکسیل استات

تجهیزات مورد نیاز

- دستگاه مولد اتمسفر کم هوازی یا کیت‌های تجاری، دارای قابلیت تأمین ۵ تا ۷ درصد O_2 و ۵ تا ۱۰ درصد CO_2
- انکوباتور با قابلیت تنظیم دمای ۲۵، ۳۷ و ۴۱/۵ درجه سانتیگراد
- میکروسکوپ نوری
- میکروسکوپ اختلاف فاز (فاز کنتراست) یا زمینه سیاه

نکات مهم قبل از انجام آزمون

- کمپیلوباکتر به انجماد حساس است و تا قبل از رسیدن به آزمایشگاه و انجام آزمون در دمای یخچال نگهداری شود.
- کلیه آبگوشت‌های غنی کننده را قبل از انجام آزمون، به دمای محیط برسانید.
- به دلیل حساسیت گونه‌های جنس کمپیلوباکتر به اکسیژن، آزمون‌های تشخیصی و تأییدی را در کوتاه‌ترین زمان ممکن انجام دهید.
- انتخاب طرح انجام آزمون بر اساس ماهیت نمونه

طرح‌های انجام آزمون بر اساس ماهیت نمونه

- طرح A

تشخیص کمپیلوباکتر با غنی سازی در نمونه‌های با تعداد کم کمپیلوباکتر و سطح پایین از فلور میکروبی زمینه (مانند غذاهای فرآوری شده)

- طرح B

تشخیص کمپیلوباکتر با غنی سازی در نمونه‌های با تعداد کم کمپیلوباکتر و سطح بالایی از فلور میکروبی زمینه (مانند نمونه های گوشت خام و شیر خام)

- طرح C

تشخیص کمپیلوباکتر با پلیت گذاری مستقیم (بدون غنی سازی) در نمونه‌های با تعداد زیاد کمپیلوباکتر (مانند مدفوع ماکیان)

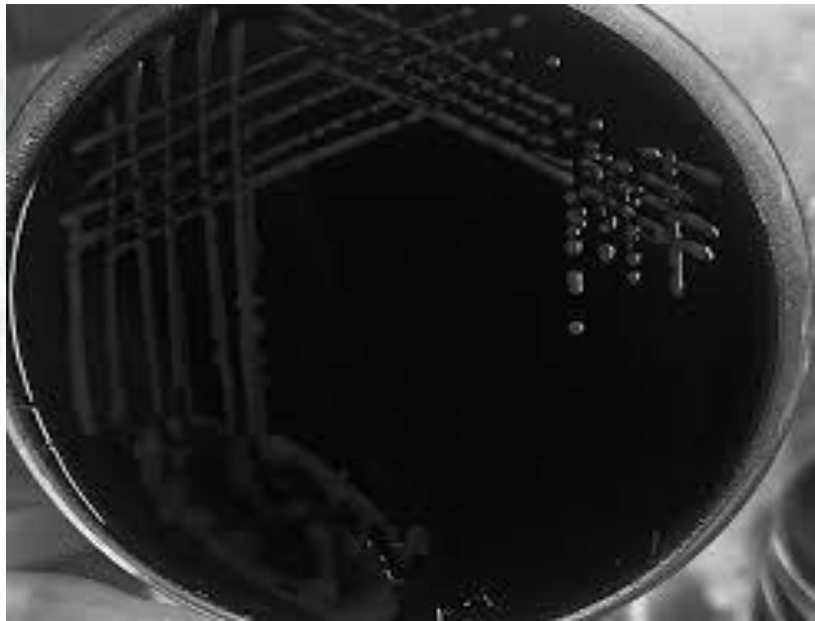
روش انجام آزمون (طرح A)

- افزودن ۱۰ گرم/ میلی لیتر نمونه + ۹۰ میلی لیتر آبگوشت غنی کننده بولتون
- انکوبه گذاری در اتمسفر کم هوازی در دمای ۳۷°C به مدت ۴ تا ۶ ساعت
- ادامه انکوبه گذاری در دمای ۴۱/۵°C به مدت ۴۰ تا ۴۸ ساعت
- کشت خطی بر روی محیط کشت mCCD آگار و محیط کشت دوم
- انکوبه گذاری در اتمسفر کم هوازی در دمای ۴۱/۵°C به مدت ۴۰ تا ۴۸ ساعت
- بررسی پلیت‌ها از نظر تشکیل کلنی‌های تیپیک یا مشکوک

روش انجام آزمون (طرح B)

- افزودن ۱۰ گرم/ میلی لیتر نمونه + ۹۰ میلی لیتر آبگوشت غنی کننده پرستون
- انکوبه گذاری در اتمسفر کم هوازی در دمای ۴۱/۵°C به مدت ۲۲ تا ۲۶ ساعت
- کشت خطی بر روی محیط کشت mCCD آگار
- انکوبه گذاری در اتمسفر کم هوازی در دمای ۴۱/۵°C به مدت ۴۰ تا ۴۸ ساعت
- بررسی پلیت‌ها از نظر تشکیل کلنی‌های تیپیک یا مشکوک

کلنی‌های تیپیک بر روی محیط کشت mCCD آگار به رنگ خاکستری مایل به سفید اغلب با جلای سبز فلزی، مسطح و مرطوب بوده که تمایل به پخش شدن دارند.



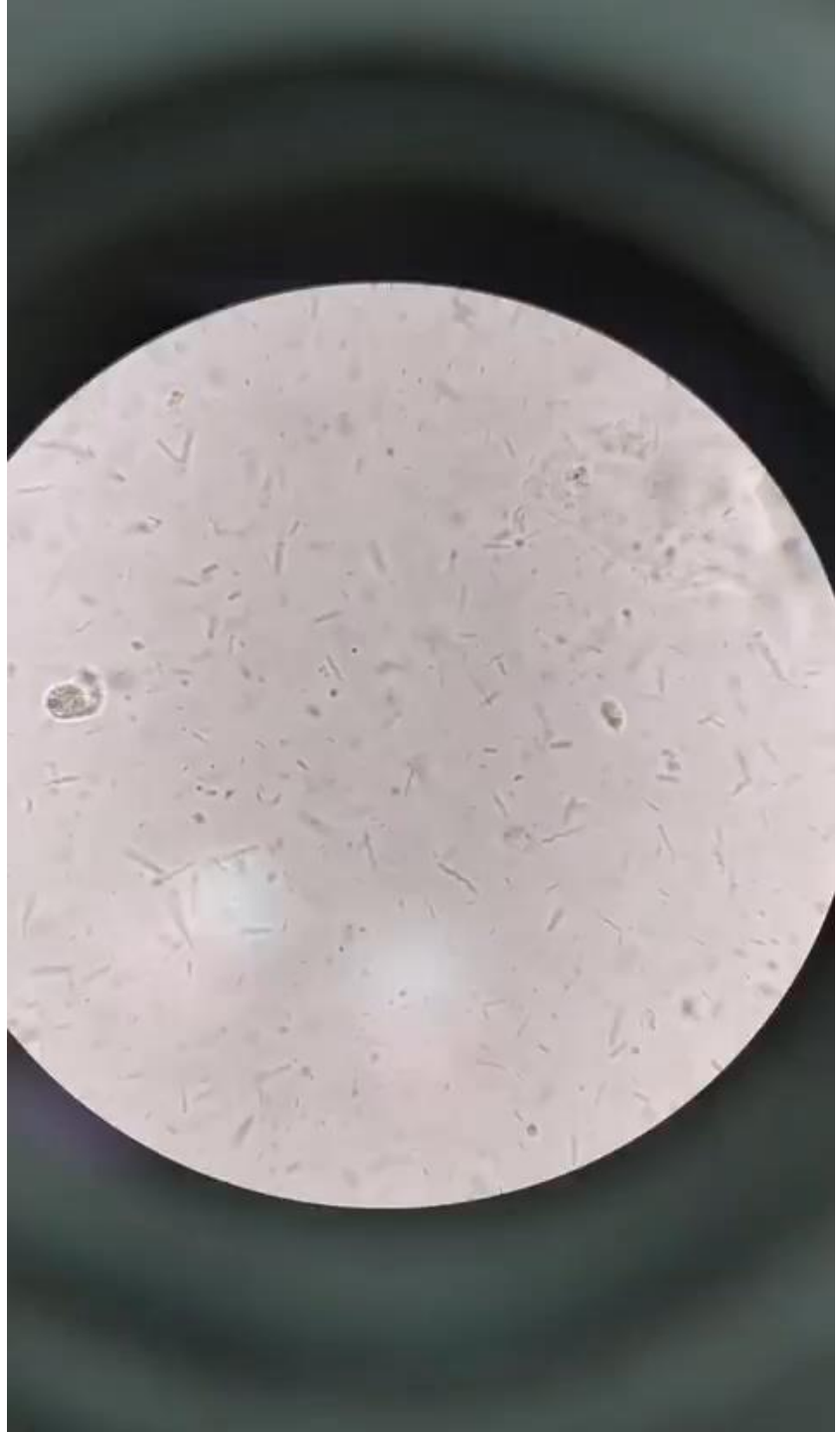
انجام آزمون‌های تأییدی

- در طول مدت انجام آزمون‌های تأییدی، علاوه بر تسریع بخشیدن در مدت زمان انجام این آزمون‌ها، پلیت‌ها را در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.
- به منظور ازیاد کلنی/ کلنی‌های مشکوک و یا تیپیک جدا شده جهت انجام آزمون‌های تأییدی، آن‌ها را بر روی محیط کشت بلاد آگار انتخابی (مانند کلمبیا بلاد آگار) کشت داده و پلیت‌ها را در اتمسفر کم هوازی و در دمای ۴۱/۵ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری نمایید.
- دست کم یک کلنی مشکوک و یا تیپیک برای انجام آزمون‌های تأییدی انتخاب نمایید.
- انتخاب ۴ کلنی مشکوک دیگر اگر این کلنی منفی بود.

آزمون‌های تأییدی- بررسی ریخت شناسی و تحرک

- جهت انجام این آزمون نیاز به میکروسکوپ فازکنتراست یا زمینه سیاه می‌باشد.
- کمپیلوباکترها به شکل باسیل‌های گرم منفی خمیده با حرکت مارپیچی به شکل پیچ خوردن مشاهده می‌شوند.

FIGURE 24.1A Electron micrograph of *Campylobacter jejuni*.



آزمون‌های تأییدی- رنگ آمیزی گرم

- کمپیلوباکترها، باسیل‌های گرم منفی با اشکال کاما، S یا بال پرنده دریایی (Gull wing) مشاهده می‌شوند که به کمک تاژک قطبی منفرد، متحرک می‌باشند.

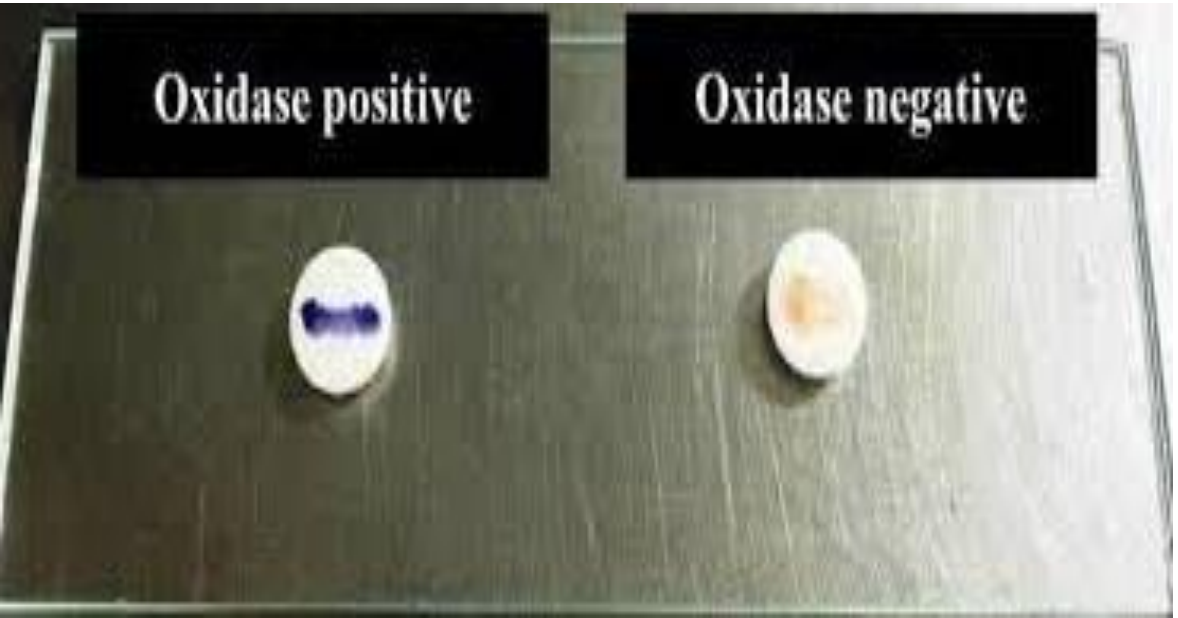
آزمون‌های تأییدی- بررسی رشد در شرایط هوازی

- کلنی/ کلنی‌های مشکوک رشد یافته را بر سطح محیط کشت کلمبیا بلاد آگار کشت داده و در شرایط هوازی و در دمای ۲۵ درجه به مدت ۴۰ تا ۴۸ ساعت انکوبه گذاری نمایید. پلیت‌ها را از نظر رشد یا عدم رشد بررسی نمایید.

- کمپیلوباکترها قادر به رشد در شرایط مذکور نمی‌باشند.

آزمون‌های تأییدی- آزمون اکسیداز

- کلنی‌های مشکوک و یا تیپیک رشد داده شده بر روی محیط کشت کلمبیا بلاد آگار را با معرف اکسیداز تازه تهیه شده، آغشته نمایید. ظهور رنگ ارغوانی، بنفش یا آبی تیره در عرض ۱۰ ثانیه نشان دهنده مثبت بودن واکنش است.
- کمپیلوباکترها، اکسیداز مثبت می‌باشند.



مشخصات جنس کمپیلوباکتر

ریخت شناسی (مورفولوژی)	باسیل‌های کوچک خمیده
تحرک	حرکت سریع و ناگهانی مارپیچی (Darting motlilty)
رشد هوازی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد	منفی
فعالیت اکسیداز	مثبت

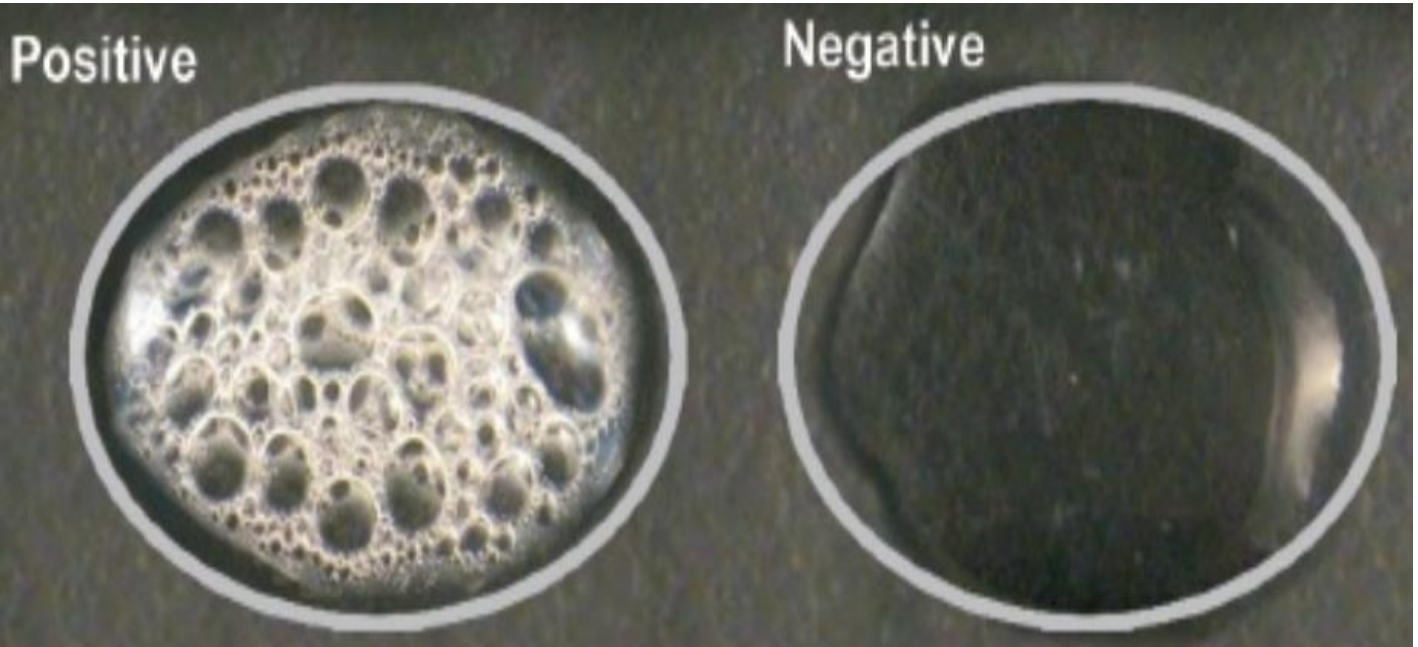
آزمون‌های تأییدی تکمیلی- آزمون هیدرولیز هیپورات

- کشت کلنی‌های مشکوک و یا شاخص رشد کرده بر روی محیط کشت کلمبیا بلاد آگار در لوله حاوی ۰/۴ml محلول سدیم هیپورات
- قراردادن لوله‌ها به مدت ۲ ساعت در حمام آب ۳۷ °C
- افزودن ۰/۲ml معرف نین هیدرین به لوله‌های فوق
- گرمخانه گذاری در حمام آب ۳۷ °C به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه
- ظهور رنگ بنفش تیره نشان دهنده واکنش مثبت است.
- کمپیلوباکتر ژژونی، هیدرولیز هیپورات مثبت است

و بقیه‌ی گونه‌های این جنس، منفی می‌باشند.

آزمون‌های تأییدی تکمیلی- آزمون کاتالاز

- ایجاد حباب‌های گاز ناشی از واکنش آنزیم کاتالاز با آب اکسیژنه ۳٪، نشان دهنده مثبت بودن واکنش است.
- کمپیلوباکترها، کاتالاز مثبت می‌باشند.



آزمون‌های تأییدی تکمیلی- آزمون هیدرولیز ایندوکسیل استات

- دیسکهای تجاری ایندوکسیل استات را با کلنیهای شاخص و یا مشکوک رشد کرده بر روی محیط کشت کلمبیا بلاد آگار، آغشته نموده و پس از افزودن چند قطره آب مقطر سترون، نتیجه را بررسی کنید.
- ایجاد رنگ آبی تیره، نشان دهنده واکنش مثبت است.
- کمپیلوباکتر ژژونی، کلی و آپسالنسیس، هیدرولیز ایندوکسیل استات مثبت هستند.

مشخصات گونه‌های کمپیلوباکتر

مشخصه	کمپیلوباکتر ژژونی	کمپیلوباکتر کلی	کمپیلوباکتر لاری	کمپیلوباکتر آپسالنسیس
کاتالاز	+	+	+	−
هیدرولیز هیپورات	+	−	−	−
هیدرولیز ایندوکسیل استات	+	+	−	+