**بنام خدا**

**میکروبشناسی پزشکی مورای**

**2016**

**باکتری شناسی**

**مترجم:اباذر پورنجف ابراهیم کوهساری مهرداد غلامی میثم حسن نژاد بی بالان**

**تحت نظارت**

**دکتر غلامرضا ایراجیان دکتر رمضان رجب نیا**

**پروژه میکروبیوم انسان**

**باکتری هایی که در دهان ,پوست و سایر بخش های بدن تجمع می یابند متفاوت می باشند.منطقه ای از بدن که دارای بیش ترین تنوع طبقه بندی و ژنتیکی می باشد ,روده بوده و واژن از کمترین پیچیدگی برخوردار می باشد. بیشترین تعداد گونه ها در دهان و پس از آن در بینی ,روده و پوست وجود دارد و کمترین گونه های مشترک در واژن یافت میشود.باکتری های روده انسان عامل متابولیز کربوهیدرات های پیچیده (از قبیل سلولز)می باشند و همچنین اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه را فراهم می کنند.**

**بدنبال در معرض قرار گرفتن آنتی بیوتیکها و سرکوب فلور نرمال روده ای ,کلستریدیوم دیفیسل قادر به تکثیر و بیان انتروتوکسین و منجر به التهاب کلون و کولیت اولسراتیومیشود.**

**آثار تغییرات میکرو بیوم در زمینه ی بیماری زایی در بیماری التهابی روده و سرطان روده مورد بحث می باشد .تکثیر باکتری هایی از قبیل Akkermansia musiniphila که تولید کننده سولفاتاز تجزیه کننده ی بزاق است و عامل تجزیه دیواره روده است.علاوه بر این افزایش تعداد خانواده بی هوازی پرووتلاسیه که منجر به التهاب با واسطه کموکاین می شود نیز می تواند ارائه دهنده واکنش های التهابی در سلولهای در سلولهای T-helper که با کولیت در ارتباط هستند باشد.بکترو.ئیدس فراژیلیس پیش ماده ای در تومورهای روده ای و هایپرپلازی کولون است.Methanobrevibbacter smithi عضو کوچکی از میکروبیوم روده است.و موجب افزایش گوارش و جذب گلیکان های غذایی بوسیله ی Bacteroides thetaiotaomicron و سایر باکتری های روده ای مهم میشود ود ر نتیجه شاهد تراکم چربی هستیم.**

**پروبیوتیک ها**

**پروبیوتیک ها ترکیباتی از باکتری ها یا مخمرهایی می باشند که بر اثر هضم در روده تکثیر شده و تجمع می یابند (حتی بصورت دوره ای )مصرف کنندگان بر این عقیده اند که بوسیله ی ایجاد تعادل مجدد میکروبیوم و عملکرد های آن فعال می شوند (عملکرد هایی از قبیل ارتقاء هضم و جذب غذا و تعدیل پاسخ ذاتی و ایمنی فرد)معمولترین دلیل استفاده زیاد از پروبیوتیک ارتقاء و حفظ عملکرد منظم روده و افزایش تحمل لاکتوز می باشد.**

**استریلیزاسیون**

**سه پارامتر مهم در این زمینه وجود دارد ,مدت زمان قرار گرفتن در معرض بخار ,دما ,و مقدار رطوبت رایج ترین روش در چرخه استریلیزاسیون بکارگیری بخار اشباع شده در دمای 121 درجه ی سانتیگراد و مدت زمان 15 دقیقه می باشد.**

**گاز اکسید اتیلن برای استریلیزاسیون نمونه های حساس به دما یا فشار بکار گرفته میشود این فرآیند 4 ساعت طول می کشد.دزانفکتانت های سطح بالا برای وسایلی مرتبط با فرآیندهای تهاجمی که نمی توانند فرآیندهایی در برابر استریلیزاسیون مقاومت نمایند بکار گرفته میشودمانند گلوتارآلدئید ,هیدروژن پراکسید ,پر استیک اسید و ترکیبات کلری می باشد.دزانفکتانت متوسط یعنی الکلها ,ترکیب یدوفور ,ترکیبات فنلی برای تجهیزات آلوده به اسپور باکتریایی و سایر ارگانیسم های بسیار مقاوم آلوده شده اند می باشد.دز انفکتانت سطوح پایین مانند ترکیبات آمونیاک چهار ظرفیتی می باشد.**

**هالوژنها**

**هالوژن ها از جمله ترکیباتی هستند که حاوی ید یا کلر می باشند و کاربد فراو انی بعنوان ضد عفونی کننده دارند.ترکیبات یددار موثرترین هالوژن ها جهت ضد عفونی می باشند و بعنوان رسوب دهنده پروتئین ها و آنزیم های حیاتی را رسوب می دهد و سبب از بین رفتن اسپورهای باکتریایی و مایکوباکتریوم ها میشود.**

**الکل ها**

**عملکرد میکروب کشی الکل ها با افزایش طول زنجیره افزایش می یابد (5 تا 8 کربن )دو الکل پرکاربردترین شامل اتانول و پروپانول می باشد.الکل دارای قدرت نابود سازی سریع باکتری های در حال رشد ,مایکوباکریها و برخی قارچ ها و ویروس های حاوی لیپید می باشند ولی روی اسپورهای باکتریایی اثر ندارد.**

**روش های میکروسکوپ**

**قدرت تفکیک میکروسکوپ با طول موج نوری که جهت نمایش شی بکاررفته میشود تعیین میکند و زاویه ورود نور به عدسی های شیئی نیز در این امر تاثیر گذار است قدرت تفکیک زمانی در بالاترین مقدار خود است که روغن موجب کاهش پراکنش نور شود. در میکروسکوپ زمینه تاریک عدسی ها از یک کندانسور ویژه به منظور ممانعت از انتقال نور به نمونه بکار گرفته میشود و یک نور غیر مستقیم به نمونه و عدسی میرسد و سبب میشود که نمونه بر روی پیش زمینه ای تاریک ,روشن مشاهده شود.و قدرت تفکیک آن نسبت به میکروسکوپ نوری بهتر میباشد.برای بررسی جزئیات ساختار درونی میکروب ها از این نوع میکروسکوپ استفاده میشود.**

**آزمایش مستقیم**

**روش آزمایش مستقیم ساده ترین روش جهت آماده سازی نمونه به منظور بررسی میکروسکوپی میباشد و این روش می تواند نمونه را آب یا نمک بصورت سوسپانسیون در آورد و برای حل کردن مواد زمینه نمونه را با مواد قلیایی ترکیب کرد.(روش پتاس هیدروکسید)یا نمونه را با یک باز و یک رنگ متضاد (مثل لاکتوفنل ,کاتن بلو ,ید )مخلوط کرد.برای بررسی مستقیم نمونه مشکوک به باسیل سل از رنگ آمیزی اسید فاست استفاده میشود.**

**موفقیت روش های کشت توسط بیولوژی ارگانیسم ,محل عفونت و کیفیت محیط کشت تعیین میشود.باکتری لژیونلا یک پاتوژن مهم تنفسی می باشد و با این حال این ارگانیسم هرگز در محیط کشت معمولی آزمایشگاهی رشد نمکند و جهت رشد به محیط آهن و ال سیستئین اضافه کرد.کمپیلوباکتر یک پاتوژن روده ای ارئست و برای جداسازی در محیط انتخابی و در دمای 42 درجه سانتیگراد در یک اتمسفر میکروآروفیلیک انکوبه شود.کلامیدیا یک باکتری پاتوژن داخل سلولی اجباری است و باید در سلول زنده رشد کند.باکتری استافیلوکوکوس اورئوس عامل سندروم شوک توکسیک استافیلوککی است و کشت خون آن تقریبا همیشه منفی می اشد.**

**محیط کشت**

**برای باکتری هایی مانند هموفیلوس و برخی از سویه های بیماری زا ی نایسریا از محیط شکلات آگار استفاده میشود.**

**محیط تایوگلیکولات براث ,یک محیط غنی شده که برای جداسازی شمار اندکی از باکتری ها ی هوازی و بی هوازی بکار می روداین محیط حاوی کازئین هضم شده ,گلوکز ,عصاره مخمر ,سیستئین و سدیم تیوگلیکولات میباشد.محیط کشت سابرو دکسترزو آگار یک محیط انتخابی برای جداسازی قارچ ها می باشد.محیط مک کانکی آگار یک آگار انتخابی حاوی پپتون ,نمک های صفراوی ,لاکتوز,نوترال رد,و کریستال ویوله می باشد.برای جداسازی استافیلوکک از محیط مانیتول سالت آگار استفاده میشود.برای جداسازی پاتوژن های روده ای سالمونلا و شیگلا از محیط انتخابی XLD استفاده میشود.روی این محیط کشت باکتری هایی که لاکتوز,ساکارز,یا گزلوز را تخمیر می کنند کلنی هایی زرد رنگ تولید می کنند ,شیگلا این کربوهیدرات ها را تخمیر نمی کند بنابراین کلنی های قرمز تولید می کند ,سالمونلا گزیلوز را تخمیر میکند اما لیزین را دکربوکسیله کرده و محصول دی آمین قلیایی کاداورین تولید میکند و سبب خنثی سازی محصولات تخمیراسیدی شده و کلنی های قرمز رنگ تولید میکند.اغلب سالمونلاها توانایی تولید هیدروژن سولفید را داشته و و در حضور فریک آمونیوم سیترات به رنگ تیره در خواهد آمد.محیط کشت لونشتاین جانسن جهت جلوگیری از رشد باکتری ها ی گرم مثبت مالا شیت گرین به آن اضافه میشود.**

**انواع محیط های کشت**

**محیط های کشت می توانند به چهار دسته تقسیم شود .1) محیط های غنی غیر انتخابی 2)محیط انتخابی 3)محیط افتراقی 4)محیط اختصاصی**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **غیر انتخابی** |  | **ترکیب محیط** |
|  | **بلاد آگار** | **محیط پایه,برین هارت اینفوزیون آگار,بروسلا بیس,خون گوسفند,اسب ,خرگوش**  |
|  | **شکلات آگار** |  |
|  | **مولر هینتون** |  |
|  | **تیوگلیکولات براث** |  |
|  | **سابرودکستروز آگار** |  |
| **انتخابی و افتراقی** | **مانیتول سالت آگار** |  |
|  | **مک کانکی آگار** |  |
|  | **گزیلوز لیزین دی اکسی کولات آگار** |  |
|  | **محیط لوین اشتاین جانسن آگار**  |  |
|  | **میدل بروک آگار** |  |
|  | **کروم آگار** |  |
| **اختصاصی** | **سیستئین تلوریت آگار** |  |
|  | **لیم براث** |  |
|  | **رگان لام آگار** |  |
|  | **مک کانکی سوربیتول آگار** |  |

**محیط های غنی کننده غیر انتخابی**

**این محیط ها جهت رشد اغلب ارگانیسمها یی که نیازهای رشدی پیچیده ای ندارند .طراحی شده است.**

**بلاد آگار (Blood agar )**

**انواع زیادی از محیط های بلاد آگار در آزمایشگاههای بالینی مورد استفاده قرار می گیرد .محیط دارای دو ترکیب اصلی می باشد,محیط پایه (برای مثال برین هارت اینفوزیون آگار,بروسلا بیس )و ترکیب دوم خون گوسفند ,اسب ,خرگوش ,مکمل های دیگری نیز می توانند افزوده شوند تا رشد ارگانیسم ها در این محیط کشت افزایش یابند.**

**شکلات آگار( Chocolate agar )**

**محیط تغییر یافته ی بلاد آگار می باشد.زمانی که خون با هموگلوبین به محیط پایه حرارت دیده (داغ )افزوده می شود.رنگ محیط قهوه ای میشود (دلیل نامگذاری این محیط )برخی باکتری ها مانند هموفیلوس و برخی از سویه های بیماری زای نایسریا که در محیط بلاد آگار رشد نمی کند ,توانایی رشد در محیط شکلات آگار را دارند.**

**مولر هینتون آگار(Muller Hinton agar ):**

**محیط توصیه شده برای آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری ها می باشد.ترکیبات این محیط شامل عصاره گوشت گاو و کازئین ,نمک ها ,کاتیون های دو ظرفیتی و نشاسته ی که جهت تکرار پذیری نتایج آزمایش ها ضروری است.**

**تیوگلیکولات براث (Thioglycolat broth ):**

**یک محیط غنی شده که برای جداسازی شمار اندکی از باکتری های هوازی و بی هوازی به کار می رود.اما اغلب آن ها حاوی تیوگلیکولات می باشند.استفاده از همین (Hemine ) و ویتامین K به عنوان مکمل موجب افزایش شانس جداسازی باکتری های بی هوازی میشود.**

**سابرو دکستروز آگار (Sabouraud dextrose agar ):**

**این محیط حاوی کازئین هضم شده و بافت حیوانی همراه با گلوکز می باشد که جهت جداسازی قارچ به کار گرفته میشود .فرمولاسیون های مختلفی برای این محیط کشت طراحی شده است اما پر کاربردترین آنها دارای غلظت کمی از گلوکز و PH خنثی می باشند. این محیط می تواند به عنوان یک محیط انتخابی برای قارچ ها تهیه شود.**

**محیط های انتخابی و افتراقی**

**محیط انتخابی جهت جداسازی ارگانیسم های خاص در مخلوطی از سایر ارگانیسم های دیگر (برای مثال یک پاتوژن در مدفوع )بکار می رود.این محیط حاوی مکمل هایی می باشد که مانع از رشد ارگانیسم های ناخواسته می شود.همچنین می توان با افزودن ترکیبات خاصی به این محیط ها امکان شناسایی یک ارگانیسم در یک ترکیب را فراهم آورد که با این کار تبدیل به یک محیط افتراقی می شود.(برای مثال با افزودن لاکتوز و معرف PH جهت شناسایی باکتری های تخمیرکننده ی لاکتوز)در ذیل مثال هایی از محیط های انتخابی و افتراقی آورده شده است.**

**مک کانکی آگار (Macconkey agar )**

**یک آگار انتخابی است که برای باکتری های گرم منفی استفاده میشود.همچنین یک آگار افتراقی برای تفکیک باکتری های تخمیر کننده ی لاکتوز و باکتری های غیر تخمیرکننده لاکتوز محسوب میشود.محیط حاوی پپتون ,نمک های صفراوی ,لاکتوز ,نوترال رد و کریستال ویوله مانع از رشد باکتری های گرم مثبت میشود.باکتری های تخمیر کننده لاکتوز ,اسید تولید می کنند که موجب تشکیل رنگ قرمز در حضور نوترال رد میشود.**

**مانیتول سالت آگار(Manitol salt agar )**

**محیط انتخابی است که برای جداسازی استافیلوکک ها بکار میرود .محیط حاوی کازئین هضم شده و بافت حیوانی , عصاره گوشت گاو ,مانیتول ,نمک و فنل قرمز می باشد.استافیلوکوکو س ها می توانند در حضور غلظت بالای نمک رشد نماید .و استافیلوکک اورئوس می توا ند مانیتول را تخمیر نماید و کلنی هایی زرد رنگ را بر روی محیط ایجاد می کند.**

**گزیلوز لیزین دی اکسی کولات آگار (XLD )**

**محیطی انتخابی برای شناسایی سالمونلا و شیگلا در کشت های روده ای است.این محیط ,نمونه ای از رویکرد بسیار هوشمندانه جهت شناسایی باکتری های مهم موجود در میان ترکیبی از باکتری های نه چندان مهم می باشد.محیط مذکور حاوی عصاره با گزیلوز ,لیزین ,لاکتوز ,ساکارز ,سدیم دی اکسی کولات ,سدیم تیوسولفات ,فریک آمونیوم سیترات و فنل رد می باشد.سدیم دی اکسی کولات مانع رشد اکثر باکتری های غیر بیماریزا می شود.باکتری هایی که معمولا لاکتوز ,ساکارز یا گزیلوز را تخمیر می کنند.کلنی هایی زرد رنگ تولید می کنند.شیگلا این کربوهیدرات را تخمیر نمی نماید.بنابر این کلنی های قرمز رنگ تولید می کنند. سالمونلا ,گزیلوز را تخمیر می کند اما لیزین را دکربوکسیله می کند و محصول دی آمین قلیایی کاداورین تولید می کند که سبب خنثی سازی محصولات تخمیر اسیدی شده و کلنی های قرمز رنگ می شود.از آنجا که اغلب سالمونلا ها توانایی تولید هیدروژن سولفید از سدیم تیوسولفات را دارند ,کلنی ها در حضور فریک آمونیوم سیترات به رنگ تیره در خواهد آمد و بنابر این سالمونلا از شیگلا تشخیص داده میشود.**

**محیط لون اشتاین (Lowenstein Jensen )**

**این محیط برای جاسازی مایکوباکتریوم ها استفاده میشود و حاوی گلیسرول ,پودر سیب زمینی ,نمک و تخم مرغ کاملا منعقد شده (جهت انعقاد محیط )می باشد.به منظور جلوگیری از رشد باکتری های گرم مثبت ,مالاشیت گرین به آن اضافه میشود.**

**میدل بروک آگار (Middlebroek agar )**

**این محیط نیز برای جداسازی مایکوباکتریوم ها بکار می رود و حاوی مواد مغذی مورد نیاز برای رشد مایکوباکتریوم ها است(یعنی نمک ها ,ویتامین ها ,اولئیک اسید ,اسید ,آلبومین ,کاتالاز ,گلیسرول ,گلوکز )و مالاشیت گرین نیز به منظور جلوگیری از رشد باکتری های گرم مثبت استفاده میشود.برخلاف محیط لونشتاین جانسن ,این ماده با آگار بشکل جامد در می آید.**

****

**کروم آگار (CHROM agar )**

**محیط افتراقی و انتخابی برای جداسازی و شناسایی انواع مختلفی از باکتری ها (برای مثال استافیلوکوکوس اورئوس, باکتری روده ای )و مخمر کاندیدا آلبیکنس بکار می رود در واقع این محیط ,برای رشد گونه های کاندیدا طراحی شده است.این محیط دارای کلرامفنیکل می باشد که مانع از رشد باکتری ها و مخلوطی از سوبستراهای کروموژنیک اختصاصی می باشد.گونه های مختلفی کاندیدا دارای آنزیم هایی می باشند که می توانند یک یا چند ماده مختلف مصرف کنند و ترکیبی رنگی را منتشر سازند و در نهایت کلنی هایی سبز ,کاندیدا تروپیکالیس موجب تشکیل کلنی ارغوانی رنگ و کاندیدا کروزنی موجب تشکیل کلنی های صورتی می شوند.**

****

**آگار مهار کننده کپک (Inhibitory mold agar )**

**محیط انتخابی غنی شده است که جهت جداسازی قارچ های بیماریزا از درماتوفیت ها بکار می رود .کلرامفنیکل به منظور مهار رشد باکتری های آلوده کننده به محیط افزوده میشود.**

**تشخیص مولکولی**

**برای نمونه RFLP در تمایز سویه های مختلف ویروس هرپس سیمپلکس (HSV )مفید می باشدپروب های DNA می توانند توالی های ژنتیکی ویژه ای را در نمونه های بافتی بیوپسی فیکس شده توسط هیبریداسیون درجا (in situ hybridization )را شناسایی کنند. در روش RT-PCR (واکنش زنجیره پلیمراز ترانس کریپتاز معکوس) که نوعی PCR میباشد برای تبدیل RNA ویروس پیامبر به DNA قبل از تکثیر PCR بکار گرفته میشود.روش DNA با زنجیره شاخه دار (Branch chain DNA assay )روش هیبریدی و جایگزین برای PCR یا RT-PCR جهت بررسی مقادیر اندک از توالی RNA یا DNA می باشد.برای جداسازی پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی روش مورد استفاده SDS-PAGE (سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید ژ الکتروفورزیس )می باشد.**

**روش های مولکولی**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **تکنیک** | **هدف** | **کاربرد بالینی** |
| **RFLP** | **مقایسه DNA** | **اپیدمیولوژی مولکولی سویه های HSV-1** |
| **هیبریداسیون درجا(in situ hybridization )** | **شناسایی و موقعیت یابی توالی های DNA در بافت** | **شناسایی DNA غیر تکثیری ویروس (مانند CMV و پاپیلومای انسانی )** |
| **Dot blot** | **شناسایی توالی DNA در محلول** | **شناسایی DNA ویروسی** |
| **Southern blot** | **شناسایی و ویژه گی توالی های DNA بوسیله اندازه** | **شناسایی سویه های ویروسی خاص** |
| **Northern blot** | **شناسایی و ویژه گی توالی های RNA بوسیله اندازه** | **شناسایی سویه های ویروسی خاص** |
| **PCR**  | **تکثیر نمونه های DNA بسیار رقیق شده(کم )** | **شناسایی DNA ویروسی** |
| **RT-PCR**  | **تکثیر نمونه های RNA بسیار رقیق شده** | **شناسایی RNA ویروسی** |
| **Real time PCR** | **تعیین کمیت DNA و RNA بسیار کم در نمونه** | **سنجش کمی ژنوم Viral load**  |
| **Branch –chain PCR** | **تکثیر نمونه های PCR و RNA بسیار کم در نمونه** | **سنجش کمی DNA و RNA در نمونه** |
| **MALDI-TOF طیف سنج جرمی** | **آنالیز سریع و حساس RNA ,DNA و پروتئین** | **آنالیز توالی ,شناسایی میکروب** |
| **SDS-PAGE** | **جداسازی پروتئین ها بر مبنای وزن مولکولی** | **اپیدمیولوژی مولکولی HSV** |

**اصول کلی تشخیص آزمایشگاهی**

**روش های شناسایی**

**کمپلکس آنتی ژن –آنتی بادی را میتوان به صورت مستقیم و با استفاده از روش های رسوب گذاری (پرسیپیتاسیون )یا با نشاندار نودن آنتی بادی به وسیله ی یک ماده رادیواکتیو ,فلورسنت یا پروب آنزیمی و یا به صورت غیر مستقیم از طریق شناسایی یک واکنش آنتی بادی مانند تثبیت کمپلمان بررسی کرد.**

**روش های ایمنولوژی انتخابی**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **تکنیک** | **هدف** | **کاربردهای کلینیکی** |
| **انتشار دوگانه ایمونو اخترلونی** | **شناسایی و مقایسه آنتی ژن و آنتی بادی** | **آنتی ژن قارچی و آنتی بادی** |
| **ایمنوفلورسانس** | **شناسایی و مکان یابی آنتی ژن** | **آنتی ژن ویرال در بیوپسی(مانند هاری و هرپس سیمپلکس)** |
| **Western blot** | **شناسایی آنتی ژن اختصاصی آنتی بادی یا آنتی ژن** | **تایید تست سرولوژیک مثبت ضد HIV** |
| **کمپلمان فیکساسیون** | **سنجش کمی تیتر آنتی بادی اختصاصی** | **آنتی بادی قارچ و ویروس** |

**طبقه بندی باکتری ها**

**تمایز اولیه بین باکتری ها از طریق ویژگی های رشد بر روی محیط های غذایی و انتخابی مختلف امکان پذیر است.باکتری ها به صورت کلنی رشد نموده ,هر کلنی شبیه با میلیون ها ارگانیسم است.از مجموع مشخصه های کلنی از قبیل رنگ , واندازه ,شکل و بو برای افتراق باکتری ها استفاده میشود. با بهره گیری از محیط های رشد مناسب می توان مقاومت به برخی از آنتی بیوتیک ها , با تخمیر برخی قندها (مثلا لاکتوز برای تمایز بین اشرشیا کلی و سالمونلا )و یا لیز گلبول قرمز (0ویژگی همولیتیک استرپتوکک)و یا هیدرولیز لیپیده (مثل لیپازگلستریدیوم )را تعیین نود.(کوکسی ,میله ای ,مارپیچی ,خمیده)و توانایی شان در حفظ رنگ گرم (گرم منفی یا گرم مثبت )از روش های اولیه جهت تمایز باکتری ها محسوب میشود.یک باکتری کروی شکل مثل استافیلوکک یک کوکسی است.یک باکتری میله ای شکل مانند اشرشیا کلی یک باسیل میباشد و تروپونما شبیه ماریک اسپیریلیوم است.بعلاوه گو نه های نوکاردیا و اکتینومایسس ظاهر رشته ای منشعب شبیه به قارچ دارندو برخی باکتری ها ساختارهای تجمعی را تشکیل می دهند مانند دستجات خوشه انگوری در استا فیلوکوک اورئوس و یا دیپلوکوکوس (دو سلول با هم )در گونه های نایسریا و استرپتوکک مشاهده میشود..**

**در باکتری گرم مثبت باکتری برنگ بنفش (ارغوانی )مشاهده میشود. رنگ در ساختار ضخیم ,متقاطع و شبیه توری پپتیدوگلیکان موجود در اطراف سلول به دام می افتد.باکتری گرم منفی لایه ی نازکی از پپتیدوگلیکان داشته که توانایی نگهداری رنگ کریستال ویوله را نداشته ,بنابر این سلول با برنگ متضاد سافرانین رنگ شده و به رنگ قرمز دیده میشود.رنگ گرم برای باکتری هایی که تحت فقر غذایی (فاز پیری یا سکون)یا تیمار آنتی بیوتیکی قرار گرفته و پپتیدوگلیکان تجزیه شده است ؛قابل اعتماد نیست.**

**ساختار غشاء باکتری ها**

|  |
| --- |
| **باکتری گرم مثبت** |
| **ساختار** | **اجزاء شیمیایی** | **عملکرد** |
| **پپتیدوگلیکان** | **زنجیره گلیکان شامل :استیل گلوکز آمین و ان استیل مورامیک اسید با اتصال متقاطع پلهای پپتیدی** | **شکل و ساختار سلولی,حفاظت در برابر محیط و سیستم کمپلمان** |
| **تیکوئیک اسید** | **پلی ریبیتول فسفات یا گلیسرول فسفات با اتصال متقاطع به پپتیدوگلیکان**  | **انعطاف دیواره سلولی,تجمع یون کلسیم** |
| **لیپوتیکوئیک اسید** | **تیکوئیک اسید حاوی لیپید** | **فعال سازی دفاع ذاتی میزبان** |
| **پروتئین** | **کووالان یا متصل به پپتیدوگلیکان یا تیکوئیک اسید** | **فرار از ایمنی** |
| **باکتری گرم منفی** |
| **پپتیدوگلیکان** | **نوع نازک دیواره ای که در گرم مثبت دیده میشود** | **شکل و ساختار سلولی** |
| **فضای پره پلاسمیک** |  | **آنزیم های دخیل در انتقال تجزیه و سنتز** |
| **غشاء خارجی** |  | **ساختار سلول ,حفاظت در برابر محیط میزبان** |
| **پروتئین** | **کانال پورین** | **نفوذ مولکولهای کوچک هیدروفیل ,منع نفوذ برخی آنتی بیوتیک ها** |
|  | **سیستم های ترشحی** | **نفوذ و انتقال پروتئین ها از خلال غشاء از قبیل فاکتورهای ویرولانس** |
|  | **لیپوپروتئین** | **اتصال غشاء خارجی به پپتیدوگلیکان** |

**جمع آوری ,انتقال و فرآوری نمونه خون**

**کشت خون یکی از مهمترین روش های بکار رفته در آزمایشگاه میکروبشناسی می باشد.فاکتور اصلی تعیین کننده موفقیت کشت خون ,حجم خون مورد آزمایش است.بر ای مثال اگر بجای 10 میلی لیترخون 20 میلی لیتر خون کشت داده شود میزان نتیجه مثبت 40 درصد افزایش می یابد.زیرا مبتلایان به سپسیس کمتر از یک ارگانیسم درهر میلی لیتر خون شان یافت میشود. تقریبا 20 میلی لیتر خون برای بزرگسالان برای کشت خون نیاز میباشد ولی در نوزادان و کودکان کمتر میباشد.**

**جمع آوری نمونه باکتریولوژیک ,باکتری های بیماریزا**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **نمونه** | **سیستم انتقالی** | **حجم نمونه** |
| **خون ,کشت باکتری های معمول** | **بطری کشت خون حاوی محیط مغذی**  | **بالغین:20 میلی لیتردر هر کشت****کودکان:10-5 میلی لیتر در هر کشت** **نوزادان:2-1 میلی لیتر در هر کشت** |
| **مایع مغزی نخاعی** | **تیوب های استریل درپیچ دار** | **5-1 میلی لیتر** |

**شناسایی اولیه باکتری های جدا شده از کشت**

**استافیلوکوکوس اورئوس:**

**کوکسی گرم مثبت در دستجات بزرگ ,کلنی های بتا همولیتیک ,کاتالاز مثبت ,کواگولاز مثبت**

**استرپتوکوکوس پایوژنز:**

**کوکسی گرم مثبت در زنجیره های بلند ,کلنی های کوچک با ناحیه بزرگی از همولیز بتا ,کاتالاز منفی ,PYR مثبت**

**استرپتوکوکوس پنومونیه:**

**کوکسی های گرم مثبت دو تایی با زنجیره کوتاه ,کلنی کوچک آلفا همولیتیک ,کاتالاز منفی و محلول در صفرا**

**گونه های انتروکوکوس**

**کوکسی های گرم مثبت دوتایی با زنجیره کوتاه ,کلنی بزرگ آلفا یا غیرهمولیتیک , کتالاز منفی ,PYR مثبت**

**لیستریا مونوسیتوژنز**

**باسیل کوچک گرم مثبت ,کلنی کوچک با بتا همولیز ضعیف,حرکت مشخص (Tumling )**

**گونه های نوکاردیا**

**رنگ گیری ضعیف (گرم و اسید فست اصلاح شده )باسیل های باریک رشته ای و منشعب ,رشد آهسته ,کلنی کرکی (هایف های هوایی )**

**مایکوباکتریوم توبرکلوزیس**

**باسیل های اسید فاست قوی ,رشد آهسته ,کلنی غیر رنگی ,تشخیص با شناساگرهای مولکولی اختصاصی**

**انتروباکتریاسه**

**باسیل های گرم منفی با رنگ آمیزی دو قطبی (رنگ گیری بیش تر در انتهاها )به طور معمول سلولهای منفرد ,کلنی های بزرگ ,رشد بر روی محیط مک کانکی آگار(لاکتوز ممکن است تخمیر شود )اکسیداز منفی.**

**سودوموناس آئروژینوزوا**

**باسیل های گرم منفی با رنگ آمیزی یکسان معمولا بصورت دوتایی ,کلنی های بزرگ و سبز فلورسانت ,معمولا بتا همولیتیک ,بوی میوه (شبیه به انگور )رشد روی محیط مک کانکی آگار (غیر تخمیری )اکسیداز مثبت**

**استنوتروفوموناس مالتوفیلا**

**باسیل های گرم منفی با رنگ آمیزی یکسان معمولا بصورت دوتایی ,رنگ سبز بروی بلاد آگار ,رشد بر روی مک کانکی آگار (غیر تخمیری )اکسیداز منفی**

**گونه های آسینتوباکتر**

**کوکوباسیلهای بزرگ گرم منفی بصورت سلولهای تکی یا دوتایی ,رنگ کریستال ویوله را نگه داشته و ممکن است به صورت کوکسی های دو تایی گرم مثبت به نظر برسند ,رشد بر روی محیط مک کانکی آگار و بلاد آگار (ممکن است لاکتوز را اکسید کرده و بنفش کم رنگ دیده شوند)اکسیداز منفی**

**گونه های کمپیلوباکتر**

**باسیل های خمیده و گرم منفی بصورت دو تایی (جفت های s شکل )رشد بر روی محیط بسیار اختصاصی برای کمپیلوباکتر ,عدم رشد بر روی محیط های معمولا (بلاد ,شکلات ,مک کانکی آگار )**

**گونه های هموفیلوس**

**کوکوباسیل های کوچک گرم منفی بصورت سلول های تکی رشد بر روی شکلات آگار و نه بلاد آگار یا مک کانکی آگار ,اکسیداز مثبت.**

**گونه های بروسلا**

**کوکوباسیل های بسیار کوچک ,گرم منفی بصورت سلولهای تکی ,رشد آهسته ,عدم رشد بر روی محیط مک کانکی آگار ,دارای خطر زیستی**

**گونه های لژیونلا**

**رنگ گیری ضعیف ,باسیل های نازک گرم منفی ,رشد آهسته ,رشد بر روی محیط آگار اختصاصی ,عدم رشد بر روی محیط های بلاد ,شکلات ,مک کانکی آگار**

**کلستریدیوم پرفرنجنس**

**باسیل های بزرگ مستطیلی با اسپورهای نامشخص ,رشد سریع ,کلنی های منتشر شونده با منطقه دوگانه همولیز(منطقه بزرگ آلفا همولیز همراه با ناحیه داخلی بتا همولیز)بی هوازی اجباری**

**گونه های باکتروئیدس فراژلیس**

**رنگ گیری ضعیف ,پلی مورف (طول متفاوت )باسیل های گرم منفی ,رشد سریع که با حضور صفرا در محیط تحریک میشود,بی هوازی اجباری**

**ساختار باکتری ها**

**باکتریهای گرم مثبت**

**یک باکتری گرم مثبت ,دارای یک دیواره سلولی ضخیم و چند لایه حاوی مقادیر زیادی پپتیدوگلیکان بوده که غشاء پلاسمایی را احاطه کرده است.پپتیدوگلیکان اسکلت خارجی شبیه توری است که از جهت عملکردی مشابه اسکلت خارجی حشرات است.بر خلاف اسکلت خارجی حشرات ,پپتیدوگلیکان سلول دارای منافذ کافی به منظور انتشار متابولیت ها به غشا پلاسمایی می باشد.مدل جدید پپتیدوگلیکان نشان می دهد که گلیکان با گسترش از غشاء پلاسمایی همچون خارهایی دیده میشود که با زنجیره های پپتیدی کوتاه اتصال متقاطع دارد.پپتیدوگلیکان برای ساختار همانند سازی و حیات در شرایط نامساعد متداول که باکتری ها در آن رشد می کنند ضروری است.پپتیدوگلیکان با لیزوزیم تجزیه میشود.لیزوزیم آنزیمی است که در اشک و مخاط انسان یافت میشود اما توسط باکتری ها و سایر ارگانیسم ها نیز تولید میشود.لیزوزیم سبب برش اسکلت پلی ساکاریدی پپتیدوگلیکان میشود.بدون پپتیدوگلیکان باکتری ها در برابر تغییرات فشار اسمزی خلال غشا پلاسمایی توان مقاومت نداشته و لیز میشود.حذف دیواره سلولی منجر به تولید یک پروتوپلاست شده که در صورت عدم تثبیت فشار اسمزی لیز میشود.دیواره سلولی گرم مثبت ها شامل پروتئین ,تیکوئیک اسید و لیپوتایکوئیک اسید و پلی ساکارید C ,پروتئین M استرپتوکک و پروتئین A استاف اورئوس بصورت کووالان به پپتیدوگلیکان متصل است.**

**کشت سلول**

**برخی از باکتری ها و تمام ویروس ها میتوانند بصورت تک سلولی بر روی یک سطح رشد و تقسیم شوند.برخی از این کشت ها کاملا پایدارند و برای مدت طولانی قابلیت نگهداری دارند.این کشت ها بصورت تجاری وجود دارد . ورود میکروب به سلول با حضور گیرنده های خاص تنظیم میشود ,بنابراین توانایی آلوده کردن رده های سلول های خاص میتواند وجه افتراق باکتری با ویروس جهت شناسایی آنها باشد**

**رنگ های افتراقی**

**انواع مختلفی از رنگ های افتراقی جهت رنگ آمیزی اختصاصی ارگانیسم ها با اجزای مواد سلولی به کار گرفته میشوند.رنگ گرم از شناخته شده ترین و پرکاربردترین روش ها تلقی میشود و نیز اساس طبقه بندی فنوتیپیک باکتری ها می باشد.مخمرها میتوانند با این روش ها رنگ شوند(مخمر گرم مثبت است)رنگ های هماتوکسیلین آهن و تریکروم در شناسایی انگل ها ی تک یاخته بسیار سودمند می باشند و رنگ رایت –گیمسا جهت شناسایی انگل های خون و سایر ارگانیسم ها ی انتخاب شده استفاده میشوند.رنگ هایی از قبیل نقره متنامین و آبی تولوئیدین جای خود را به رنگ های حساس تر و از نظر تکنیکی ساده تر مثل رنگ های افتراقی یا فلورسانت داده اند.**

**رنگ آمیزی اسید فست**

**حداقل از سه نوع رنگ آمیزی اسید فست مختلف استفاده میشود و روش کار هر یک از آنها بر این اصل استوار است که برخی ارگانیسم ها رنگ اصلی و اولیه خود را در حضور رنگ برهای قوی مثل اسید-الکل حفظ می کنند.زیل - نلسون از قدیمی ترین روش ها می باشد اما نیازمند به حرارت در طول فرآیند رنگ آمیزی است.بسیاری از آزمایشگاهها این روش را تغییر داده و از روش رنگ اسید – فست سرد (روش کینیون )یا رنگ فلوروکروم (روش اورامین –رودامین )بهره می برند.روش فلوروکروم روش انتخابی است.زیرا میتوان به سهولت قسمت وسیعی از نمونه را با جستجو سریع ارگانیسم های فلورسنس در زمینه تاریک مورد بررسی قرار داد.برخی ارگانیسم ها اسید فاست نسبی می باشند و رنگ اولیه خود را تنها در حضور محلول اسیدی ضعیفی حفظ می کنند.این ویژگی تنها در تعداد محدودی از ارگانیسمها وجود دارد.و این امر در شناسایی اولیه آنها با ارزش است.**

**مکانیسم اثر آنتی بیوتیکها**

**ممانعت از سنتز دیواره سلولی**

**رایجترین مکانیسم فعالیت آنتی بیوتیکها تداخل در سنتز دیواره سلولی است.اکثر آنتی بیوتیک های موثر بر دیواره سلولی بعنوان آنتی بیوتیک بتالاکتام (مثل پنیسیلین ,سفالوسپورینها ,سفامایسین ها ,کارباپنم ها ,مونوباکتام ها ,و مهار کننده بتا لاکتاماز )دسته بتدی میشوند.**

**آنتی بیوتیک بتا لاکتام**

**اصلی ترین ساختار دیواره سلولی اکثر باکتری ها لایه پپتیدوگلیکان می باشد.ساختار پایه از یک زنجیره 10 تا 65واحد دی ساکاریدی شامل مولکولهای یک در میان ان استیل گلوکز آمین و ان استیل مورامیک اسید تشکیل شده است.این پپتیدها توسط اتصالات عرضی یا پل های پپتیدی مرتبط شده است.**

**باکتری ها توسط سه مکانیسم عمومی نسبت به آنتی بیوتیک ها ی بتا لاکتام مقاوم میشوند:1- کاهش غلظت آنتی بیوتیک ها در محل مصرف دیواره سلولی 2-کاهش اتصال آنتی بیوتیک به PBP 3- هیدرولیز آنتی بیوتیک توسط بتالاکتاماز باکتریایی,مکانیسم اول مقاومت تنها در باکتری های گرم منفی دیده میشود.**

**مقاومت میتواند همچنین از طریق تغییر محل اتصال آنتی بیوتیک بتا لاکتام به PBP ایجاد شود. این مورد از طریق 1-تولید بیش از حد PBP 2-پیدایش PBP جدید (مثل مقاومت به متی سیلین در استاف اورئوس )3- تغییر در PBP (پروتئین متصل شونده به پنی سیلین ) موجود به واسطه نوترکیبی(مثل مقاومت به پنی سیلین در استرپتوکک پنومونیه ).**

**پنی سیلین با باند شدن به PBP باعث جلوگیری از آنزیم ها برای ساخت پپتیدوگلیکان میشود.**

**تتراسایکلین سبب جلوگیری از طویل شدن پلی پپتید در سایت 30s ریبوزوم میشود.**

**ماکرولیدها سبب جلوگیری از طویل شدن پلی پپتید در ریبوزوم 50s میشود.**

**ریفامپین سبب جلوگیری از نسخه برداری به وسیله باند شدن به DNA وابسته به RNA پلی مراز میشود.**

**اتیونامید سبب جلوگیری از سنتز مایکولیک اسیدمیشود.**

**طبقه بندی بتا لاکتاماز ها**

**بتالاکتاماز ها به چهار کلاس (A تاD )تقسیم میشوند .شایعترین بتالاکتاماز کلاس A شامل SIIV-1 و TEM-1 هستند .پنی سیلینازهایی که در باکتری های میله ای گرم منفی (مثل اشرشیا کلی و کلبسیلا)حضور داشته و دارای حداقل فعالیت روی سفالوسپورین ها میباشند. متاسفانه موتاسیون های نقطه ای ساده در ژن های کد کننده این آنزیم ها منجر به تولید بتا لاکتامازهایی وسیع الطیف نامیده میشود(ESBL )و اکثرا توسط پلاسمیدها رمزدهی میشوند.و میتوانند از ارگانیسمی به ارگانیسم دیگر بروند.کلاس بتا لاکتامازها ,متالوآنزیم های حاوی روی (Zn )بوده که طیف وسیعی بر تمام آنتی بیوتیک های بتالاکتام شامل سفامایسین و کارباپنم ها را دارند.کلاس C بتالاکتامازها از سفالوسپورینازهای اولیه بوده که توسط کروموزوم باکتریایی رمزدهی میشوند.کلاس D بتالاکتاماز ها پنی سیلیناز بوده و عمدتا در باسیل های گرم منفی یافت میشوند.**

**در سالهای اخیر مقاومت به کارباپنم ها از طریق تولید کارپنماز شایع شده است. همانطور که اشاره شد ,بتا لاکتاماز به چهار کلاس A تا D طبقه بندی میشوند.کلاس A کارپنماز در طیف وسیعی از باکتری ها شامل سودوموناس و انتروباکتریاسه (متداولترین آن کارپنماز کلبسیلا پنومونیه (KPC )یافت می شودو ارگانیسم های تولید کننده کارپنماز به تمامی بتالاکتام ها مقاوم بوده و ژن های مقاومت فقط از طریق روش های مولکولی شناسایی می شوند.کارپنمازهای کلاس B متالوبتالاکتامازهایی (وابسته به روی )هستند که در باکتری های گرم منفی یافت شده و با تست های حساسیت سنتی قابل تشخیص نیست .ارگانیسم های تولید کننده کلاس B کارباپنماز (اغلب متالوبتالاکتاماز های دهلی نو نامگذتری شده اند.(NCM )به تمامی آنتی بیوتیک های بتالاکتام به جزء آی قابل زترونام مقاوم هستند.در نهایت کلاس D کارپنماز ها برای اولین بار در آسینتوباکتریافت شد که مقاوم به تمامی آنتی بیوتیک های بتالاکتام را رمزدهی نموده و از طریق تست های حساسیت سنتی قابل شناسایی است.این گروه از کارباپنمازها دارای اهمیت اند چون سویه های اسینتوباکتر تولید کننده این کارباپنماز به تمام آنتی بیوتیک ها (به جزء موارد استثناء )مقاوم اند.**