۲. از لام‌های شیشه‌ای تمیز استفاده کرده و به‌ترتیب یک قطره از هر آنتی‌سرم را بر روی لام بریزید.
۳. جهت کنترل، یک قطره سرم فیزیولوژی را نیز بر روی لام دیگری بریزید.
۴. به‌وسیلهٔ لوپ مقداری از پرگنهٔ باکتری مشکوک (کشت تازه ۱۶ تا ۱۸ ساعته)، رشدیافته بر روی محیط‌های غیرمهاری را در قطرهٔ آنتی‌سرم و جداگانه در قطرهٔ کنترل برده، کاملاً حل کنید به‌طوری که یک قطره سوسپانسیون غلیظ و یکنواخت بوجود آید.

*** نکته: از آنجا که استفاده از محیط‌های کشت مختلف آزمون را دچار اختلال می‌سازد، جهت ارزیابی صحیح نتایج، شدیداً توصیه می‌گردد: کلنی‌ها از محیط‌های TSI، KIA یا Blood Agar برداشته شوند.**

۵. هر لام را به صورت دورانی حرکت دهید و واکنش را قبل از ۳۰ ثانیه در مقابل یک‌صفحه سیاه و مات از نظر آگلوتیناسیون به دقت مورد بررسی قرار دهید.
۶. لخته شدن مشخص و یا آگلوتیناسیون کامل در این مدت، بدون مشاهدهٔ لخته در قطرهٔ کنترل باید به‌عنوان واکنش مثبت درنظر گرفته شود. نمونه‌ای که موجب ایجاد یک واکنش مثبت مشخص با آنتی‌سرم می‌شود، باکتریی با ساختارهای آنتی‌ژنی یادشده بر روی قطره‌چکان است.
۷. اگر باکتری مورد آزمایش در سرم فیزیولوژی نیز خودبه‌خود آگلوتینه می‌شود، این باکتری از نوع Rough بوده و نتیجه آزمون قابل‌اعتماد نمی‌باشد.
۸. در صورت عدم‌مشاهده آگلوتیناسیون در هیچ‌یک از قطره‌ها، احتمال دارد سویه از جمله سویه‌های کپسول‌دار باشد، بنابراین جهت اجتناب از منفی کاذب، حتماً لازم است آزمون بر روی میکروب با حرارت کشته‌شده، انجام گردد.

۲-۵. تفسیر نتایج:

+۴ ۱۰۰ درصد آگلوتیناسیون، زمینه کاملاً شفاف، ذرات مشخص
+۳ ۷۵ درصد آگلوتیناسیون، زمینه نسبتاً شفاف
+۲ ۵۰ درصد آگلوتیناسیون، زمینه نسبتاً مات
+۱ ۲۵ درصد آگلوتیناسیون، زمینه کدر
– عدم آگلوتیناسیون

نتیجه مثبت: آگلوتیناسیون واضح در کمتر از ۳۰ ثانیه (هرگونه واکنش مثبت بعد از ۳۰ ثانیه باید منفی درنظر گرفته شود).
نتیجه منفی: عدم مشاهده آگلوتیناسیون در هیچ‌یک از قطره‌ها.

*** توجه: لازم به ذکر است که برخی از سرگروپ‌های شیگلا دیسانتری ماهیتاً واجد واکنش آگلوتیناسیون ضعیف‌تری نسبت به بقیه سروگروپ‌ها هستند.**

۳-۵. آزمون آگلوتیناسیون برای میکروب کشته شده با حرارت:

۱. ۰/۵ تا ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی داخل یک لوله بریزید.
۲. توسط لوپ مقداری از باکتری رشد کرده بر روی محیط‌های نامبرده را داخل آن منتقل کنید تا یک سوسپانسیون غلیظ و یکنواخت حاصل شود.
۳. آنگاه سوسپانسیون موردنظر را داخل حمام آب‌جوش ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد، به‌مدت ۶۰ دقیقه قرار دهید.
۴. بعد از خنک شدن، سوسپانسیون به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه در 1000rpm سانتریفوژ کرده و آزمایش را از رسوب حاصل تکرار کنید.

۴-۵. آماده‌سازی:

آنتی‌سرم‌ها و وسایل را به دمای اتاق برسانید و قبل از انجام آزمایش اطمینان حاصل کنید که لام‌ها و پیپت‌ها تمیز و عاری از هرگونه ماده اضافی مانند دترژنت‌ها هستند.

۵-۵. محدودیت‌های انجام آزمایش:

۱. گزارش صحیح واکنش‌های سرولوژیک وابسته به خلوص کشت، خصوصیات مورفولوژیک و واکنش‌های بیوشیمیایی است که باکتری را به‌عنوان شیگلا مطرح می‌سازد.
۲. متدهای سرولوژیک به تنهایی نمی‌توانند جهت جداسازی گونه‌های شیگلا به‌کار گرفته شوند.
۳. گرمای بالای (منابع خارجی) مانند: لوپ باکتریولوژیک، منبع نوری و غیره ممکن است از ایجاد یک سوسپانسیون یک دست از باکتری ممانعت کرده یا موجب تبخیر یا پرسیپیتاسیون مخلوط شوند که در نتیجه آن واکنش مثبت کاذب رخ می‌دهد.

۴. کلنی‌های خشن (Rough) ایجاد آگلوتینه کاذب می‌کنند، بنابراین در آزمایش سرولوژیک انتخاب کلنی‌های نرم (Smooth) ضروری است.
۵. آنتی‌سرم پلی‌والان شیگلا، با استفاده از کشت مستقیم باکتری‌ها بر روی محیط آگار مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. این آنتی‌سرم‌ها نباید با استفاده از ایجاد سوسپانسیون در محلول ۰/۸۵ درصد NaCl یا سایر حلال‌ها مورد سنجش قرار گیرند. اگر مصرف‌کننده مراحل دیگری غیر از مراحل ذکر شده را به‌کار گیرد. هر شماره ساخت آنتی‌سرم باید با کشت‌های کنترل شناخته شده مورد سنجش قرار گرفته تا روش تغییریافته (modified) مورد تأیید قرار گیرد.

مراجع:

1. Janda J.M., Abbot S.L. 1998. The Enterobacteria, Lippincott- Raven, Philadelphia.
2. Balous A. and Duerden B. 1998, Topley and Wilson`s Microbiology and Microbial Infections (Vol 1 and Vol 2). Arnold Company, London, U.K.
3. Murray P.R., Baroon J., Pfaller M.A. et al. 2003, Manual of Clinical Microbiology, American Societies of Microbiology press, U.S.A.
4. Mandell G.L., Bennet J.E. and Dolin R. 2000, Principles and Practice of infectious disease, Churchill Livingstone, New york, U.S.A.
5. Encyclopedia of Microbiology, 2000, Vol 2. Academic press.

پژوهشی و فنی
بهارافشان
عضو انجمن تخصصی مراکز تحقیق و توسعه صنعت، معدن و تجارت

آنتی‌سرم‌های چند دودمانی

«شناسایی شیگلا»

"Shigella"

www.bird-bahar.com
E-mail:bahar@bird-bahar.com

تهران، خیابان کارگر شمالی، نرسیده به پمپ‌بنزین، ساختمان آزمایشگاه بهار
شماره ۱۶۲۷، صندوق پستی: ۷۶۸-۱۴۱۸۵
تلفن: ۸۸۹۶۲۴۶-۸۸۹۶۱۸۶۹، نمابر: ۸۸۹۶۰۴۴۵
کارخانه: کرج، شهرک صنعتی بهارستان، خیابان گلستان چهارم، پلاک ۵۷

زبان گویای دانش فرآورده پزشکی

۱. معرفی

۱-۱. مقدمه:

با وجود شیوع شیگلوزیس یا دیسانتری کلاسیک در همه نقاط دنیا، میزان شیوع این بیماری در کشورهای درحال توسعه، چندهزار بار بیشتر از میزان آن در ایالات‌متحده است. بیشتر موارد در کودکان ۶ ماه تا ۱۰ سال رخ می‌دهد. شدت بیماری براساس ابتلا به گونه‌ها و سروتیپ‌های مختلف، متغیر بوده اما در اغلب موارد با اسهال شدید، تب و بی‌حالی همراه است. ناقلین بدون علامت نیز دیده شده‌اند. دفع از طریق مدفوع در بیمارانی که هنوز درمان آنتی‌بیوتیکی دریافت نمی‌کنند می‌تواند بین یک تا چهار هفته دیده شود، اما ناقل بودن بیشتر از یک‌سال به‌ندرت دیده شده است.

مهم‌ترین راه انتشار بیماری، از یک فرد به فرد دیگر است و به‌هرحال شیوع اغلب در نتیجه تماس نزدیک ایجاد می‌شود (برای مثال در مراکز مراقبت و نگهداری کودکان و سالمندان شیوع بیشتری از آن دیده می‌شود).

تقریباً ۶۰ درصد کودکان کمتر از یک‌سال که در معرض باکتری قرار می‌گیرند، بیمار می‌شوند، اما این میزان در سنین بالاتر حدود ۲۰ درصد است. *S.sonnei* گونه غالب جدا شده در کشورهای صنعتی است و پس از آن *S.flexneri* بالاترین میزان جداسازی را دارد. جداسازی *S.boydii* نسبتاً نادر است و جداسازی **S.dysenteriae تیپ ۱** فقط در کشورهای درحال توسعه یا در اشخاصی که به این مناطق سفر می‌کنند، دیده شده است.

۱-۲. خصوصیات کلی:

شیگلا باکتری گرم منفی متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است. این ارگانیسم اولین‌بار در سال ۱۸۹۸ توسط «Shiga» معرفی شد و سرانجام در سال ۱۹۱۹ به احترام او «Shigella» نامیده شد. چهارگونه شناخته شده این جنس واجد سروتیپ‌های متعددی هستند که با وجود جداول بیوشیمیایی جهت شناسایی این‌گونه سروتیپ‌ها، شناخت آنها کاملاً مرتبط با انجام آزمون‌های سرولوژیک **(با استفاده از آنتی‌سرم مربوطه)** است. از آنجا که گونه‌های این جنس بدون حرکت هستند، بنابراین شناسایی سرولوژیک آنها براساس آنتی‌ژن سوماتیک O می‌باشد.

۲. شناسایی

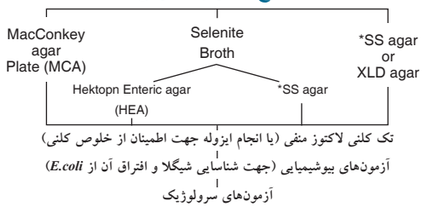
۲-۱. شیگلا و E.coli:

سویه‌های ویژه‌ای از *E.coli* ممکن است از نظر بیوشیمیایی مشابه *Shigella* باشند، زیرا هر دو می‌توانند لاکتوز منفی، بدون حرکت، گاز منفی، لایزین منفی و حتی آزمون ONPG و استات آنها منفی باشد. این سویه‌ها تا سال ۱۹۴۰ اعضایی از جنس شیگلا به‌نام «Alkalescens Shigella» بودند که براساس توصیه کمیته بین‌المللی انتروباکتریاسه از جنس شیگلا خارج شدند که این به‌علت خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی‌ژن‌های کپسولی و سوماتیک آن‌ها بود که آنان را بیشتر به اشرشیا نزدیک می‌کرد و سرانجام آنان را به‌نام «*E.coli ADO*» (Alkalescens-Dispar Organisms) تقسیم‌بندی کردند که امروزه در تمامی جداول انتروباکتریاسه Inactive *E.coli* که خود شامل «*E.coli ADO*» است، به‌چشم می‌خورد.

در سال ۱۹۷۳، Brenner و همکارانش با استفاده از ارتباطات DNA تأیید کردند که این دو جنس (اشیرشیا و شیگلا) در واقع متعلق به یک جنس هستند، اما علی‌رغم این حقیقت به‌دلایل کلینیکی و اپیدمیولوژیک این دو جنس همچنان به‌صورت منفک از یکدیگر قرار می‌گیرند؛ بنابراین شناسایی گونه‌های شیگلا شامل جداسازی میکروارگانیسم، تشخیص بیوشیمیایی و تأیید سرولوژیک باکتری می‌باشد. تأیید سرولوژیک با استفاده از واکنش میکروارگانیسم (آنتی‌ژن) با آنتی‌بادی موجود در آنتی‌سرم است که موجب ایجاد یک لخته ماکروسکپی که آگلوتیناسیون نامیده می‌شود، صورت می‌گیرد.

ایجاد واکنش آگلوتیناسیون همولوگ، سریع با قدرت بالا و پیوند محکم می‌باشد، اما از آنجا که میکروارگانیسم (آنتی‌ژن) ممکن است با آنتی‌بادی‌های تولیدشده بر علیه سایر گونه‌ها، ایجاد واکنش‌های هترولوگ کند؛ باید توجه کرد که این واکنش‌ها ضعیف و آرام بوده و ممکن است این واکنش‌های ضعیف و ناخوانا موجب خطا و سردرگمی در تشخیص واکنش‌های سرولوژیک گردد. بنابراین واکنش آگلوتیناسیون همولوگ باید با تشخیص مورفولوژیک و بیوشیمیایی میکروارگانیسم تأیید گردند.

۲-۲. جداسازی و کشت نمونه‌های مدفوع:



Differentiation of *E.coli-Shigella* (جدول ۱)

Test	Reaction of the following species		
	Shigella	*E.coli* inactive	*E.coli*
Lysine decarboxylase	-	V	+
Motility	-	-	+
Gas from glucose	-	-	+
Acetate utilization	-	V	+
Christiansen`s citrate	-	V	d
Mucate	-	V	+
Lactose	-	d	+

*Abbreviations: -, negative; +, Positive, V, less than or equal to 50% Positive, d, less than or equal to 25% positive.

*ss agar مانع رشد بعضی از سویه‌های شیگلایی می‌شود، بهتر است از HE یا XLD استفاده شود.

۳. مشخصات فرآورده

۳-۱. محتویات:

جعبه محتوی بروشور راهنما و چهار ویال قطره‌چکان با حجم ۱/۷ ml است که این مقدار جهت انجام ۵۶ آزمون، کافی است.

Shigella Antiserum Poly Group A	۱. یک ویال
Shigella Antiserum Poly Group B	۲. یک ویال
Shigella Antiserum Poly Group C	۳. یک ویال
Shigella Antiserum Poly Group D	۴. یک ویال

۳-۲. پایداری و ذخیره:

باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود و پایداری آن تا تاریخ انقضاء بر روی برچسب قید شده است.

۴. هشدارها و احتیاط‌ها

۱. این فرآورده تنها برای استفاده ***in-vitro*** می‌باشد.
۲. قبل از استفاده حتماً بروشور را مطالعه فرمایید.
۳. از استفاده پس از تاریخ انقضاء بپرهیزید.
۴. هنگام انجام آزمون از دستکش و پوشاننده‌های مناسب استفاده کنید.
۵. پس از استفاده، لام و اپلیکاتور استفاده شده را داخل ظرف محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم (آب‌ژاول) قرار دهید.
۶. از آلوده شدن محلول بر اثر تماس با میکروب‌ها جلوگیری کنید.
۷. درصورت کدربودن یا لخته‌بودن آنتی‌سرم‌ها، از استفاده از آنها بپرهیزید.
۸. در آنتی‌سرم‌های حاضر، Thiomersal به‌عنوان یک نگهدارنده به‌کار رفته است که در صورت بلع می‌تواند موجب مسمومیت شود. همچنین این ماده در صورت تماس با آلومینیوم می‌تواند ایجاد خوردگی کند.
۹. از ذوب و انجماد آنتی‌سرم‌ها بپرهیزید که می‌تواند موجب ایجاد رسوب و از دست رفتن توان آنها شود.
۱۰. برای انجام آزمایش حتماً از نور مناسب و صفحه تیره استفاده کنید.

۵. روش انجام آزمون و تفسیر نتایج

کشت‌هایی که از طریق آزمون‌های بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیکی میکروب موردنظر شناخته شده‌اند می‌توانند جهت هدف موردنظر مورد آزمایش قرار گیرند.

۵-۱. آزمون آگلوتیناسیون بر روی لام:

جهت بررسی آنتی‌ژن O به روش direct:

۱. آنتی‌سرم‌های *Shigella* را قبل از آزمایش از یخچال بیرون آورده، به درجه حرارت اتاق برسانید. اطمینان حاصل کنید که لام‌ها و پیپت‌ها تمیز و عاری از هرگونه ماده اضافی مانند دترژنت‌ها هستند.