

آنتی ژن‌های سوماتیک یا آنتی ژن‌های سطحی سلول می‌شوند. برای شناسایی سروولوژیکی این سویه‌ها، باید سوسپانسیون از باکتری مورد نظر در سرم فیزیولوژی تهیه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰°C قرار داد.

مشخصات فرآورده:

(A) محتویات:

جعبه محتوی بروشور راهنما و چهار ویال قطره چکان با حجم 1.7ml است. که این مقدار جهت انجام ۵۶ آزمون، کافی می‌باشد.

- ۱. یک ویال..... Salmonella Antiserum Poly Serogroups A
- ۲. یک ویال..... Salmonella Antiserum Poly Serogroups B
- ۳. یک ویال..... Salmonella Antiserum Poly Serogroups C
- ۴. یک ویال..... Salmonella Antiserum Poly Serogroups D

(B) پایداری و ذخیره:

باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود و پایداری آن تا تاریخ انقضای قید شده بر روی برجسب می‌باشد.

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 (آب ژاول) قرار دهید.
۶. از آلوده شدن محلول بر اثر تماس با میکروب‌ها جلوگیری کنید.
۷. در صورت کدر بودن یا لخته بودن آنتی‌سرم‌ها، از استفاده از آنها بپرهیزید.

۸. در آنتی‌سرم‌های حاضر، Thiomersal به‌عنوان یک نگهدارنده به کار رفته است که در صورت بلع می‌تواند موجب مسمومیت گردد. 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 گردد.

۱۰. برای انجام آزمایش حتماً از نور مناسب و صفحه تیره استفاده کنید.

روش انجام آزمون و تفسیر نتایج:

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

(A) آزمون آگلوتیناسیون بر روی لام: جهت بررسی آنتی ژن O به روش direct:

۱. آنتی‌سرم‌های *Salmonella* را قبل از آزمایش از یخچال بیرون آورده ، به‌درجه حرارت اتاق برسانید. اطمینان حاصل کنید که لام‌ها و پیپت‌ها تمیز و عاری از هرگونه ماده اضافی همانند دترژنت‌ها هستند.
۲. از لام‌های شیشه‌ای تمیز استفاده نموده و به‌ترتیب یک قطره از هر آنتی‌سرم بر روی لام بریزید.
۳. جهت کنترل، یک قطره سرم فیزیولوژی را نیز بر روی لام دیگری بریزید.
۴. به‌وسیله لوپ مقداری از کلنی باکتری مشکوک (کشت تازه ۱۶ تا ۱۸ ساعته)، رشد یافته بر روی محیط‌های غیرمهاری را در قطره آنتی‌سرم و جداگانه در قطره کنترل برده، کاملاً حل نمایسد به‌طوری‌که 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 KIA، TSI یا Blood Agar برداشته شوند.

۵. هر لام را به‌صورت دورانی حرکت دهید و واکنش را قبل از ۳۰ ثانیه در مقابل یک صفحه سیاه و مات از نظر آگلوتیناسیون به‌دقت مورد بررسی قرار دهید.

۶. لخته شدن مشخص و یا آگلوتیناسیون کامل در این مدت، بدون مشاهده لخته در قطره کنترل باید به‌عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شود. نمونه‌ای که موجب ایجاد یک واکنش مثبت مشخص با آنتی‌سرم می‌گردد، باکتریی با ساختارهای آنتی ژنی یاد شده بر روی قطره چکان است.

۷. اگر باکتری مورد آزمایش در سرم فیزیولوژی نیز خودبه‌خود آگلوتینه می‌شود، این باکتری از نوع Rough بوده و نتیجه آزمون قابل‌اعتماد نمی‌باشد.

توجه: یک روش قابل اعتماد جهت تأیید یا رد Rough بودن کلنی تهیه یک سوسپانسیون غلیظ از باکتری موردنظر و حرارت دادن آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه می‌باشد با ایسن روش در صورت Rough بودن کلنی‌ها محلول به‌صورت دو فاز مجزا درمی‌آید.

۸. در صورت عدم مشاهده آگلوتیناسیون در هیچ‌یک از قطره‌ها، احتمال دارد سویه از جمله سویه‌های کپسول‌دار باشد بنابراین جهت اجتناب از منفی کاذب، حتماً لازم است آزمون پس از حذف کپسول مجدداً انجام گردد.

(B) 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 سی‌ثانیه (هرگونه واکنش مثبت بعد از ۳۰ ثانیه باید منفی در نظر گرفته شود).

نتیجه منفی: عدم مشاهده واکنش در هیچ‌یک از قطره‌ها.

توجه: لازم به‌ذکر است که برخی از سروگروپ‌های سالمونلا گروه D و C واجد کپسول می‌باشند که در این صورت نتیجه منفی کاذب ایجاد می‌کنند و جهت رفع این مشکل باید به‌روشی که در ذیل آمده است کپسول را از بین برده و سپس آزمون را با گروه D و C آنتی‌سرمی تکرار کرد.

(C) آزمون آگلوتیناسیون برای میکروب کپسول‌دار:

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 مورد نظر را داخل حمام آب‌جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار دهید.
۴. بعد از خنک شدن، سوسپانسیون به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در 1000rpm سانتریفوژ نموده و آزمایش را از رسوب حاصل تکرار کنید.

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 همانند دترژنت‌ها هستند.

(D) محدودیت‌های انجام آزمایش:

۱. گزارش صحیح واکنش‌های سرولوژیک وابسته به خلوص کشت، خصوصیات مورفولوژیک و واکنش‌های بیوشیمیایی است که باکتری را به‌عنوان سالمونلا مطرح می‌سازد.
۲. متدهای سرولوژیک به تنهایی نمی‌توانند جهت جداسازی گونه‌های سالمونلا به‌کار گرفته شوند.
۳. گرمای بالای (منابع خارجی) مانند: لوپ باکتریولوژیک، منبع نوری و غیره ممکن است از ایجاد یک سوسپانسیون یک‌دست از باکتری ممانعت کرده یا موجب تبخیر یا پرسپیتاسیون 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 سالمونلا، 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 به کار گیرد، هر شماره ساخت آنتی‌سرم باید با کشت‌های کنترل شناخته شده مورد سنجش قرار گرفته تا روش تغییر یافته (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., Barron 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.

علائم جهانی مربوط به فرآورده‌های تشخیص آزمایشگاهی

IVD <i>in-vitro diagnostic use only</i>	فقط برای مصرف در آزمایشگاه
REF Product Code	شماره سفارش فرآورده
LOT Lot Number	شماره ساخت فرآورده
Use by/ Expiry date	تاریخ پایداری
Store at	درجه حرارت نگهداری فرآورده
Consult instructions for use	برای روش استفاده فرآورده با سازنده تماس بگیرید



بهارافشان



آنتی‌سرم‌های چند دودمانی

شناسایی سالمونلا

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

تهران، خیابان کارگر شمالی، نرسیده به پمپ‌بنزین، ساختمان آزمایشگاه بهار
شماره ۰۱۶۲۷، صندوق پستی: ۱۴۱۸۵-۷۶۸
تلفن: ۰۲۴۵-۸۸۹۶۲۲۴۶-۸۸۹۶۱۸۶۹-۸۸۹۶۰۴۴۵



مقدمه:

آنتی سرم های سالمونلا جهت شناسایی سرولوژیکی اعضاء جنس سالمونلا مورد استفاده قرار می گیرند. اعضاء این جنس به طور گسترده ای در محیط انتشار دارند و به عنوان پاتوژن های روده ای عامل طیف وسیعی از بیماری ها در انسان و حیوانات می باشند. آنها مسؤل گاستروانتریت، باکتری می، سیتی سیمی و تب های روده ای اند که تب تیفوئید مهمترین آن ها محسوب می شود. این عفونت اغلب از طریق تماس مستقیم و یا غذا و آب آلوده به مدفوع، ایجاد می شود و عامل آن *Salmonella Serotype Typhi* می باشد.

سویه های سالمونلا غیرتیفی معمولاً عامل عفونت روده ای می باشند که با اسهال، تب و کرامپ های شکمی همراه اند و اغلب به مدت یک هفته فرد را درگیر می کنند. همچنین این سویه ها به قدرت عامل عفونت های لوکالیزه مانند استنومیلیت، عفونت های ادراری و باکتری می به خصوص در اشخاص با ضعف ایمنی می باشند. آلودگی در همه سنین گزارش شده است اما میزان آلودگی در نوزادان بالاتر است.

طبقه بندی:

در سال ۱۹۷۳ Crosa و همکارانش با استفاده از هیبریدیزاسیون DNA-DNA سویه های سالمونلا را در ۵ گروه اصلی گروه بندی کردند. امروزه دو (و شاید سه) گروه اضافی مورد شناسایی قرار گرفته اند. شایع ترین سویه های عامل عفونت های انسانی در گروه I هیبریدیزاسیون DNA قرار می گیرند. دو گونه شایع اخیراً در جنس سالمونلا شناسایی شده است: *S. enterica* و *S. bongori* (که سابقاً زیرگونه ۵ شناخته می شد) سالمونلا انتریکا به ۶ زیرگونه تقسیم شده است.

- I) *Salmonella enterica Subsp. Enterica*
- II) *S. enterica subsp. Salamae*
- IIIa) *S. enterica subsp. Arizonae*
- IIIb) *S. enterica subsp. Disarizonae*
- IV) *S. enterica subsp. Houtenae*
- VI) *S. enterica subsp. Indica*

۱) یک گرم از مدفوع تازه و یا یک سوآب رکتال را باید به طور همزمان بر روی محیط مکانکی همراه با محیط های نیمه انتخابی چون هکتون انتریک آگار (HEA) یا محیط (XLD) (مناسب جهت شیگلا) و در صورت موجود نبودن محیط SS و محیط غنی کننده (Selenit broth (SF) منتقل نمود.

توجه: محیط کاملاً انتخابی توصیه شده (توسط انجمن میکروب شناسان آمریکا) جهت جداسازی *Salmonella serotype Typhi* بیسموت سولفیت آگار و محیط نیمه انتخابی توصیه شده **هکتون انتریک آگار** می باشد. (تفسیر رشد بروی این محیط ها در جدول ۳ آمده است).

پس از ۱۲-۸ ساعت انکوباسیون محیط غنی کننده، مجدداً از SF بروی دو عدد از محیط های کشت ذکر شده ایزوله شود. (۲) پلیت ها را ۲۴-۱۸ ساعت در حرارت ۳۵ درجه سانتیگراد انکوبه کنید و سپس با انتخاب کلنی های لاکتوز منفی یا هم رنگ محیط که می تواند H₂S مثبت یا منفی باشد، آزمون های بیوشیمیایی لازم را انجام دهید.

جدول ۱: آزمون های بیوشیمیایی مفید در افتراق سالمونلا از سایر اجزای خانواده انتروباکتریاسه و شناسایی سروتیپ های تیفی و پاراتیفی A

Test	Nontyphoidal Salmonella subsp. I reaction	Salmonella serotype Typhi reaction	Salmonella serotype Paratyphi A reaction
	k/Ag	k/A	k/Ag
TSI	+	+ weak	- or + weak
H ₂ S (TSI)	-	-	-
Indole	-	-	-
Methyl rd	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-
Citrate (Simmons)	+	-	-
Urea	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	-
Arginine dihydrolase	+	d	(+)
Ornithine decarboxylase	+	-	+
Motility	+	+	+
Mucate	+	-	-
Malonate	-	-	-
L(+)-Tartrate (d-tartrate ^b)	+	+	-
Growth in KCN	-	-	-
Glucose	Ag	A	Ag
Lactose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Salicin	-	-	-
Dulcitol	Ag	-	Ag ^{2 days}
Inositol	D	-	-
Sorbitol	Ag	A	Ag
ONPG ^c	-	-	-
Galacturonate	-	-	-

^aReactions after incubation at 37°C k, alkaline slant; g, gas; +, 90% or more positive within 1 or 2 day; (+), positive reaction after 3 or more days; -, no reaction (90% or more) in 7 days; d, different reactions [+,(+),-].

^bSodium potassium tartrate.

^cONPG, o-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside for derection fo b-galactosidase activity.

جدول ۲: واکنش های بیوشیمیایی مفید برای تفکیک گونه ها و زیرگونه های سالمونلا A

Test	Species or subspecies (no. of strains tested)						S.bongori (formerlyV) (16)
	S.enterica						
	I (650)	II (146)	IIIa (120)	IIIb (155)	IV (120)	VI (9)	
Dulcitol	+	+	-	-	-	d ^b	+
Lactose	-	-	- ^c	+ ^d	-	d ^e	-
ONPG	-	- ^f	+	+	-	d ^g	+
Salicin	-	-	-	-	+ ^h	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Mucate	+	+	+	- ⁱ	+	+	+
Growth in KCN	-	-	-	-	+	-	+
Gelatin (strip)	-	+	+	+	+	+	-

^aReactions after incubation at 37°C +, 90% or more positive within 1 or 2 days; (+), positive reaction after 3 or more days; -, no reaction (90% or more) in 7 days; d, different reactions [+,(+),-].

^bA total of 67% were positive.

^cA total of 15% were positive.

^dA total of 85% were positive.

^eA total of 22% were positive.

^fA total of 15% were positive.

^gA total of 44% were positive.

^hA total of 60% were positive.

ⁱA total of 30% were positive.

^jSodium potassium tartrate

جدول ۳: تفسیر رشد نمونه های مدفوع بر روی محیط های کشت

Medium	Colony morphology	Identification procedure
Differential		
MAC	Colorless or transparent	Enteric screening procedure
EMB	Colorless or transparent amber (light purple)	Enteric screening procedure
Moderately selective		
HE	Blue or Blue – green, with or without black centers	Enteric screening procedure
XLD	Red, with or without dark centers; S typhi can be orange – light pink	Enteric screening procedure
SS	Colorless, with or without black centers	Enteric screening procedure
Desoxycholate	Transparent; colorless to light pink or thin, with or without black centers.	Enteric screening procedure
Highly selective		
Brilliant green	Red, pink, or white surrounded by red zones	Enteric screening procedure
Bismuth sulfite	Black, with or without no zones around colonies	Enteric screening procedure
Other		
BAP	Predominating numbers of staphylococcus	Coagulase
	Predominating numbers of pseudomonas- like colonies	Identify nonfermenters
	Predominating numbers of yeast cells	Identify predominating yeast cells
BAP-AMP or BAP	Hemolytic and nonhemolytic non – pseudomonas colonies	Oxidase production
Campy plate	Grify to pinkish, flat to mucoid to Convex to spreading all over plate	Gram stain

^aData extracted from J.F.McFadden. 1985. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

^bMethod Used in the Laboratory to detect potential pathogens.

Results on:	LIA	Urea	Perform	Rule out
TSI				
K/A H ₂ S ⁺	K/K H ₂ S ⁺	-	Complete biochemical ID ^b	<i>Salmonella</i> spp.
K/A H ₂ S ⁺	K/K	-	Complete biochemical ID	<i>Salmonella</i> spp.
K/A G H ₂ S ⁺	K/K H ₂ S ⁺	-	Complete biochemical ID	<i>Salmonella</i> spp., <i>Edwardsiella</i> spp.
K/A G	K/K	-	Complete biochemical ID	<i>Salmonella</i> spp.
K/A G	K/K H ₂ S ⁺	-	Complete biochemical ID	<i>Salmonella</i> spp.
	K/K	-	Spot indole ^c , complete biochemical ID	<i>Salmonella</i> spp.
		-	Spot indole ^c , throw away	
	K/A	-	Complete biochemical ID and serotyping	<i>S. paratyphi</i> A,S.flexneri 6
K/A	K/K H ₂ S ⁺	-	Complete biochemical ID	<i>S. typhi</i>
	K/K	-	Spot indole ^c and oxidase ^d , Complete biochemical ID	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Plesiomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.
	K/A	-	Spot indole ^c , complete biochemical ID	<i>S. typhi</i>
	K/A	-	Complete biochemical ID	<i>Shigella</i> spp.
A/A	+	+	Oxidase ^e , Complete biochemical ID	<i>Yersinia</i> spp.
A/A	K/A	+	Complete biochemical ID	<i>Yersinia</i> spp.
		-	Oxidase ^e , Complete biochemical ID	<i>Yersinia</i> spp.
		-	Oxidase ^e , Complete biochemical ID	<i>Vibrio</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp.
	K/K	-	Oxidase ^e , Complete biochemical ID	<i>V. cholerae</i>

توجه: جهت اطمینان از خلوص کلنی بهتر است فقط از یک تک کلنی لاکتوز منفی جهت انجام آزمون ها استفاده نمود. بنابراین ایزولاسیون اولیه تک کلنی لاکتوز منفی بروی یکی از محیط های کشت اولیه (مکانکی) توصیه می شود.

(۳) آزمون های تشخیصی را براساس جدول ۱، ۲ و ۴ انجام دهید. **توجه:** استفاده از محیط لایزین آبیرون آگار LIA جهت افتراق جنس سالمونلا از سیتروباکتر ضروری است و انجام آزمون آنتی سرمی از روی کلنی های مستقیم قبل از تأیید ایزوله به عنوان جنس سالمونلا خطا می باشد.

شناسایی سرولوژیک Serogrouping:

سالمونلاها واجد دو تیپ اصلی آنتی ژن می باشند O: (سوماتیک) و H (تازه ای). آنتی ژن های O مقاوم به حرارت اند و اساس گروه بندی این ارگانیسم می باشند که براساس آن از A تا Z طبقه بندی می شوند.

بین ۹۵ تا ۹۷ درصد از سروتیپ های شایع ایزوله شده متعلق به سرو گروه های A, B, C1, C2, D, E1 تا E4 می باشند.

عموماً در آزمایشگاه های تشخیص پزشکی شناسایی تا حد سرو گروه لازم است اما در آزمایشگاه های رفرائس باید سروتیپ یا آنتی ژن های اختصاصی تعیین گردند که اغلب براساس شناسایی آنتی ژن های H یا فلاژلار می باشند. ضمناً باید هنگام شناسایی آنتی ژن های O مطمئن شد که واکنش آگلوتیناسیون به دلیل واکنش متقاطع نمی باشد. مثلاً آنتی ژن های سرو گروه A (۲ و ۱۲). B (۴ و ۵ و ۱۲) و D (۹ و ۱۲) است که همگی محتوی آنتی ژن مشترک ۱۲ می باشند که ممکن است موجب واکنش متقاطع بین این سرو گروه ها گردد. بنابراین آنتی سرم جذب شده فقط حاوی فاکتور ۲ (سرو گروه A) یا ۹ (سرو گروه D) می باشد.

Salmonella serotype Typhi و برخی سویه های *Salmonella serotype Typhi* و بعضی از سویه های *Citrobacter* واجد کپسول می باشند که به عنوان آنتی ژن Vi (ویرولان) شناسایی شده اند. این آنتی ژن موجب پوشاندن

