الدرس العملي العاشر
متابعة الكشف عن ميكروب
Staphylococcus aureus
في اللبن ومنتجاته

أهداف الدرس

- التركيز علي أهمية عدم الاعتماد علي ظهور مستعمرات مميزة علي سطح البيئات المتخصصة كدليل علي وجود الميكروب في العينات المختبرة.
- التعرف علي الأسس العلمية لاختبارات تعريف ميكروب *Staphylococcus aureus*
- التدريب علي القيام بالاختبارات التأكيدية لميكروب *Staphylococcus aureus* .

الصفات المميزة لميكـــــروب *S. aureus* والأنواع المرتبطة به من جنس *Staphylococcus*

الصفة	*aureus S*	*epidermidis S*	*hyicus S*	*intermedius S*
انتاج إنزيم الكوأجيولاز	+	-	ض*	+
انتاج الانـــزيم المحلـــل للدنا	+	-	+	+
تكوين الصبغة الصفراء	+	-	-	-
التخمـــــر اللاهـــــوائي للمانيتول	+	م**	-	-

الأجهزة والأدوات

- حضان كهربي.
- حمام مائي.
- مجهر ضوئي.
- ناشرات (Spreaders) زجاجية أو بلاستيكية.
- ماصات زجاجية معقمة ومعها ساحب بلاستيك.
- ماصات ميكرولترية.
- أسنان ماصات ميكرولترية (Tips) معقمة.
- إبر تلقيح مستقيمة وذات عقدة.
- شرائح زجاجي

المواد والمزارع البكتيرية

- بيئة أجار المانيتول الصلبة والمحتوية علي الملح (Mannitol salt agar (MSA)) معقمة ومصبوبة في أنابيب اختبار كأجار عميق (Deep agar).
- بيئة أجار مستخلص المخ والقلب الصلبة (Brain-heart infusion (BHI) agar) معقمة ومصبوبة في أطباق بتري.
- بيئة مستخلص المخ والقلب السائلة (Brain-heart infusion (BHI) broth) معقمة وموزعة في أنابيب اختبار

- بيئة أجار التولويدين والدنا الصلبة (Toluidine-DNA agar) معقمة في دورق مخروطي.
- زيت بارافين معقم.
- بلازما الدم مضاف إليها مادة EDTA .
- المحاليل اللازمة للصبغ بطريقة جرام وتشمل محلول صبغة الكريستال البنفسجي، محلول صبغة السفرانين، محلول اليودين، كحول إيثيلي (٩٥%).
- مزارع عمرها ١٨-٢٤ ساعة منماة في بيئة TSA وتم تحضيرها من المستعمرات التي أعطت صفات مميزة لميكروب *S. aureus* علي سطح بيئة BPA وذلك عند فحص عينات اللبن الخام والجبن الدمياطي في الدرس العملي السابق.

q الاختبارات التأكيدية علي مستعمرات *S. Aureus*

١. الفحص المجهري لخلايا *S. aureus* بطريقة صبغ جرام

يتم أخذ لمســـــة من المزرعـــة السابق تحضـــــيرها من أحد المستعمرات النامية علي بيئة BPA والتي تم تنميتها لمدة ١٨-٢٤ ساعة علي بيئة TSA ثم يتم فحص الخلايا بطريقة صبغ جرام كما فعلت في الدروس العملية السابقة.

٢. اختبار التخمر اللاهوائي لسكر المانيتول

يتم في هذا الاختبار الكشف عن قدرة الميكروب علي تخمير سكر المانيتول تحت الظروف اللاهوائية وفي وجود تركيز مرتفع نسبياً من كلوريد الصوديوم (٧.٥%) ويستدل علي ذلك بنمو الميكروب في البيئة المستخدمة في الاختبار مع تغير لونها نتيجة تخمر المانيتول وتكون أحماض،

q تتلخص خطوات هذا الاختبار فيما يلي

- يتم أخذ لمسة بإبرة التلقيح المستقيمة من مزرعة عمرها ١٨-٢٤ ساعة منماة علي بيئة TSA ويتم غرس هذه اللمسة في بيئة أجار المانيتول المحتوية علي الملح (Mannitol salt agar (MSA)) المصبوبة في أنابيب كأجار عميق (Deep agar).
- يصب علي سطح البيئة طبقة ارتفاعها حوالي ٢.٥ سم من زيت البارافين المعقم وذلك لجعل الوسط لاهوائياً، ثم يتم تحضين الأنابيب علي ٣٥°م لمدة ٥ أيام، ويعتبر نمو الميكروب وتغير لون البيئة إلي اللون الأصفر نتيجة إيجابية.

q اختبار تكوين الصبغة الصفراء

- تؤخذ لمسة بإبرة التلقيح ذات العقدة من مزرعة عمرها ١٨-٢٤ ساعة منماة علي بيئة TSA ويتم تخطيط تلك اللمسة علي سطح بيئة أجار مستخلص المخ والقلب (Brain-heart infusion (BHI agar) المصبوبة في أطباق.
- تحضن الأطباق علي ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة، ويعتبر ظهور مستعمرات مستديرة وذات لون أصفر نتيجة إيجابية.

q اختبار تجلط البلازما

- تؤخذ لمسة بإبرة التلقيح ذات العقدة من مزرعة عمرها ١٨-٢٤ ساعة منماة علي بيئة TSA أو مباشرة من المستعمرة النامية علي سطح بيئة BPA ثم يتم غمس هذه اللمسة في أنبوبة محتويه علي ٠.٢ -٠.٣ مللي من بيئة مرق مستخلص المخ والقلب (Brain-heart infusion (BHI)) ومزجها بشكل جيدً.
- يتم تحضين الأنابيب علي ٣٥°م لمدة ١٨-٢٤ ساعة، ثم يضاف إليها ٠.٥ مللي من بلازما دم الأرانب المضاف إليها مادة EDTA التي تمنع التجلط الطبيعي للبلازما ثم يتم مزج مكونات الأنبوبة جيداً وتحضن في حمام مائي علي ٣٥°م لمدة ٦ ساعات بحيث يتم ملاحظة تجلط البلازما كل نصف ساعة، وفي حالة تجلط البلازما يتم ملاحظة مدي تماسك الجلطة وتسجيل الوقت الذي تمت فيه.

q اختبار الإنزيم المحلل للدنا

- يتم صب ٣ مللي من بيئة أجار التولويدين والدنا (Toluidine-DNA agar) وتترك لتتصلب علي سطح الشريحة ثم يتم إزالة أجزاء من البيئة علي شكل حلقات ذات قطر يصل إلي ٢ مليمتر (بمعدل ١٠-١٢ حلقة بكل شريحة) .
- يتم تحضير مزرعة من الميكروب في بيئة BHI broth وذلك كما سبق في اختبار تجلط البلازما، مع تسخين هذه المزرعة لمدة ١٥ دقيقة علي درجة ١٠٠°م في حمام مائي، ثم يتم أخذ ١٠ ميكروليتر (µl) من المزرعة المسخنة وتضاف إلي كل حلقة علي الشريحة .
- يتم تحضين الشرائح في جو رطب علي ٣٥°م لمدة ٤ ساعات، ويعتبر ظهور منطقة وردية لامعه تمتد حوالي ١ ملليمتر من حافة الحلقة مغيره من اللون الأزرق للبيئة دليلاً علي وجود الانزيم المحلل للدنا

- **تقدير أعداد ميكروب *S. aureus* في العينات التي تم اختبارها في الدرس العملي السابق بناء علي نتائج الاختبارات التأكيدية:**
  - **طريقة العد علي الأطباق**

لاحظ أننا قمنا بتلقيح ١ مللي من كل تخفيف علي ثلاثة أطباق، ولذلك فإننا نقوم بجمع عدد المستعمرات الناتجة في كل طبق وضرب الناتج في مقلوب التخفيف فنحصل علي عدد الوحدات المكونة للمستعمرات (cfu) في ١ مللي من العينة بحيث يتم حساب متوسط العدد الناتج من التخفيفات المختلفة مع مراعاه أنه يفضل أن يتم عدد الأطباق التي يظهر عليها من ٢٠-٢٠٠ مستعمرة وبالتالي فيمكن استبعاد بعض الأطباق التي لا تحقق ذلك.

طريقة الرقم الأكثر احتمالاً

سوف نحتاج لمثال لتوضيحها، لنفترض أن عدد أنابيب TSB التي أعطت مستعمرات من الميكروب علي سطح بيئة BPA وتم التأكد منها في الاختبارات التأكيدية كانت كما يلي: ٣ أنابيب من تلك التي تم تلقيحها من التخفيف الأول (٠.١)، ٢ أنبوبة من تلك التي تم تلقيحها من التخفيف الثاني (٠.٠١)، ٠ أنبوبة من تلك التي تم تلقيحها من التخفيف الثالث (٠.٠٠١)، إذا وضعنا هذه الأعداد معاً نحصل علي الرقم ٣٢٠ وهو الرقم الذي يتم الكشف عنه فيما بعد في جداول الرقم الأكثر احتمالاً MPN ومنها يمكن الحصول علي تقدير تقريبي لأعداد الميكروب بالعينة.