GLOBAL TASK FORCE ON CHOLERA CONTROL

عزل والتعرف الأولي على ضمة الكوليرا O1/O139 من عينات البراز

ضبط الجودة للوسط والمحاليل

يجب على المختبرات التأكد من ضبط الجودة بشكل كاف للوسط والمحاليل المستخدمة. يجب اختبار كل دفعة من الوسط المحضر من مكونات فردية للتحقق من واحدة أو أكثر من الخصائص التالية:

- التعقيم / التلوث
- القدرة على دعم النمو
- القدرة على إنتاج تفاعل كيميائي حيوي مناسب (إذا كان ذلك قابلًا للتطبيق)

الإثراء في وسط الماء القلوي المحتوي على البيبتون (APW):

يُعتبر وسط الماء القلوي البيبتوني الوسط الموصى به لإثراء ضمة الكوليرا. يحسن هذا الوسط من عملية العزل عندما تكون أعداد البكتيريا قليلة)كما في حالة المرضى المتعافين أو الحاملين بدون أعراض(، أو عند وجود أعداد كبيرة من الكائنات المنافسة. تنمو أنواع Vibrio بسرعة في وسط الماء القلوي البيبتوني بفضل درجة الحموضة القلوية والملوحة، وبعد 6 إلى 8 ساعات تصبح بأعداد أكبر من الكائنات غير التابعة للضمات.

يجب أن تكون العَيِّنَة المُلقَّحة وفيرة ولكن لا يتجاوز 01% من حجم الوسط. إذا أمكن، يمكن توزيع الوسط في أنابيب صغيرة تحتوي على 2 إلى 5 مل من WPA لمراقبة النمو البكتيري بسرعة أكبر.

بعد حضانة لمدة 6 إلى 8 ساعات، تُزرع العينات على وسط صلب انتقائي وغير انتقائي، باستخدام لقطتين من سطح وأعلى الطبقة من وسط APW، حيث تفضل الضمات النمو في هذه المنطقة. لا تقم برج الأنبوب أو خلطه قبل الزرع. إذا لم يكن بالإمكان الزرع بعد 6 إلى 8 ساعات من الحضانة، يُترك لينمو طوال الليل ثم يتم زرع 01 ميكرولتر في أنبوب جديد من WPA يجب زرع الأنبوب الثاني على وسط صلب بعد حضانة لمدة 6 إلى 8 ساعات.

الأوساط الانتقائية للزرع:

يُعتبر **أجار الثيوسلفات سترات أملاح الصفراء والسكروز(TCBS)** الوسط الانتقائي المفضل لعزل ضمة الكوليرا من عينات البراز. يميز هذا الوسط ضمة الكوليرا عن باقي البكتيريا بناءً على قدرتها على النمو عليه وتخمير السكروز، مما يؤدي إلى تغير لون الوسط من الأخضر إلى مستعمرات صفراء بعد نمو لمدة 18 إلى 24 ساعة عند درجة حرارة 35 ±2 °C. المستعمرات المشتبهة تكون كبيرة (2 إلى 4 ملم)، لامعة، مفلطحة قليلًا وصفراء اللون.

يجب اختبار كل دفعة جديدة من TCBS باستخدام ضوابط إيجابية وسلبية)أي بكتيريا موجبة وسالبة لتخمير السكروز(قبل الاستخدام.

قم بتلقيح الأوساط الانتقائية بلقاح كثيف من البراز السائل أو معلق البراز أو المسحة الشرجي.

يمكن أن تتحول المستعمرات الصفراء علىTCBS إلى خضراء في درجة حرارة الغرفة إذا تُركت الأطباق لمدة تزيد عن24 ساعة. **تحقق من النمو قبل مرور 24ساعة من الزرع.**

لا يُستخدم النمو على هذا الوسط لإجراء اختبار إنزيم الأكسدة مباشرة أو للاختبار بالأمصال المضادة لـ *V. cholerae* O1 أوO139 يجب زرع المستعمرات المشتبهة على وسط غير انتقائي قبل إجراء الاختبارات الإضافية.

الأوساط غير الانتقائية (NSA):

تشمل هذه الأوساط مولر هينتون (الموصى به)، وبرين هارت إنفيوشن أجار، وتربتكيس سوي اجار . وتتميز بانخفاض الانتقائية ويجب أن يتم التلقيح عليها بشكل خفيف. عند التلقيح المباشر من العينة، قد يؤدي النمو إلى مستعمرات مختلطة، لذا غالبًا ما يكون من الضروري إعادة عزل المستعمرات المشتبهة على طبق جديد. ومع ذلك، إذا كانت المستعمرات المشتبهة معزولة بشكل جيد على الطبق الأولي، يمكن إجراء اختبار الأوكسيداز مباشرة كما هو موضح أدناه. يجب زرع المستعمرات المشتبهة المعزولة على TCBS على وسط غير انتقائي قبل متابعة الاختبارات.

اختبار الأوكسيداز:

يجب إجراء تفاعل الأوكسيداز باستخدام مزرعة طازجة (من 18 إلى 24 ساعة) **نمت على وسط غير انتقائي**. لا يُجرى هذا الاختبار من مستعمرات نمت على TCBS لأن مكونات الوسط قد تعطي نتائج خاطئة. استخدام مقبض معدني قد يؤدي إلى نتيجة إيجابية زائفة في اختبار الأوكسيداز. يُفضل استخدام حلقة تلقيح زجاجية أو بلاستيكية لضمات الكوليرا. .تعطي نتيجة إيجابية بينما البكتريا المعوية تعطي نتيجة سلبية.

اختبار التراص:

يُعتبر هذا الاختبار خطوة أساسية للتعرف الأولي على ضمات الكوليرا. يجب تحديد المجموعتين المصليتين باستخدام أمصال خاصة بالنوع O1 و O139. يُجرى اختبار التراص باستخدام مزرعة طازجة (من 18 إلى 24 ساعة) من وسط غير انتقائي. المزارع على وسط TCBS قد تعطي تفاعلات تراص ذاتي في المحلول الملحي، مما يعيق تفسير النتيجة. لا ينبغي أن يحدث تراص في المحلول الملحي. إذا حدث تراص، تكون السلالة ذات تراص ذاتي ولاحاجة لإجراء المزيد من اختبارات التراص بمصل O1 أو .O139 في هذه الحالة، يجب إرسال السلالة إلى مختبر مرجعي.