

۲۹۴۰



دانشگاه تهران دانشکده داپزشکی

شماره ۴۷۶

سال تحصیلی ۴۰-۴۱

پایان نامه
برای دریافت دکترای داپزشکی از دانشگاه تهران

مقایسه روشهای مختلف کلی متری در شیر

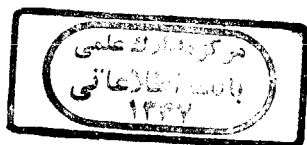
نگارش : مالک کازرونی زند

متولد ۱۳۰۱ - کرمان

هیئت داوران

آقای دکتر اسمعیل اردلان استاد دانشکده دامپزشکی (استاد راهنما و رئیس ژوری)
آقای دکتر رضاستگار استاد دانشکده دامپزشکی (داور ژوری)
آقای دکتر احمد عطائی استاد دانشکده دامپزشکی (داور ژوری)

چاپ میرهن-۳۸۴۶۹



تقدیم به :

را در مردانیکه وجودشان چراغ

راهنمای بندگان خدا از دریای

ظلمانی جهل و نادانی بوده و عمر

خود را وقف ارشاد و هدایت نوع

بشر مینمایند

تقدیریم به :

اساتید دانشمند و بزرگوارانیکه با انوار فضیلت خود قلبم را روشن ساخته و چراغ هدایت را فرا راهم نهاده اند .

استاد معظم **جناب آقای دکتر اردلان** که در راه توفیق این موهبت بزرگ بنده را یاری فرموده و همیشه خود را مرهون مراحم و الطاف بی پایان ایشان میدانم .

جناب آقای دکتر ستگار استاد بزرگواریکه از خرمن معلومات ایشان خوشه چینی نموده و افتخارش را گردی ایشانرا داشته و دارم .

جناب آقای دکتر عطائی استاد ارجمند و محبوبی که علاوه بر فرا گرفتن علوم و فنون درسی از سجایای اخلاقی ایشان نیز درسها آموخته‌ام

تقدیم به :

جناب آقای دکتر کاوه که همواره بیانات حکمت آمیز ایشان طنین انداز لوح ضمیرم بوده و از راهنمائیهای ایشان برخوردار میباشم .

آقای دکتر نشاط که از محضر فیض ایشان کامیاب گشته و همراهیهای ایشان را هرگز فراموش نمیکنم

آقای دکتر قزوینیان که از کمکهای ایشان برخوردار بوده ام
کلیه کسانی که در امر تحصیل حقیر زحمتهای کشیده و مرارتها تحمل نموده اند.

پدر بزرگوار و مادر مهربانم که هستی خود را مدیون زحمات شبانه روزی آنها میدانم
برادران و خواهران عزیزم خصوصاً **جناب سرهنگ مهدی کازرونی**
که در طول زمان تحصیل دانشکده دستگیر و کمک حالم بوده اند .

کلیه دوستان و رفقائمی که وجودشان مایه تعیش و خرسندی در زندگانی بوده است

هدیه به :

فرزندان عزیزم که نهال امید و آرزوی اینجانب در زندگانی بود و هستی وجود خود را برای ترقی و تعالی آنان خواهانم .

فهرست مندرجات

موضوع

سر آغاز

مقدمه

بخش اول

تعریف کلی فرمها

نامگذاری کلی فرمها

بخش دوم ،

اهمیت وجود کلی فرمها در شیر

بخش سوم

کلی متری و اهمیت آن در بازرسی شیر

بخش چهارم

اصول روش کلی متری

وسایل مورد نیاز کلی متری

محیطهای انتخابی

محیطهای انتخابی مایع

طرز تهیه محیطهای مایع

محیطهای انتخابی جامد

طرز تهیه محیطهای جامد

طرز عمل کلی متری

آزمایش روی محیطهای مایع

جدول ماک کردی در پنج لوله با سه رقت

» « در ۵ و سه لوله

با دورقت و یک رقت

آزمایش روی محیط جامد

بخش پنجم

عملیات انجام داده شده و مشاهدات

اظهار نظر و اخذ نتیجه نهائی

منابع

سر آغاز

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

ستایش خدا ئیرا سزا است که پرورنده جهانیا نیست و درودی بی پایان مر کسا نیرا رواست که خلق را راهنمایانند .

خدای را شکر میگویم که به این بنده توفیق عنایت فرمود مدارج عالیه تحصیل را که سالیان دراز آرزوی انجام آن را در دل میپرورانیدم طی نمود و موفق به تدوین این پایان نامه میگردم و هم بمصدق **من لم یشکر الناس لم یشکر الله** از کلیه اساتید معظم ودانشیاران و دستیاران دانشکده دامپزشکی که در امر تحصیل امثال حقیر نهایت مساعدت و جدیت خود را مبدول میفرمایند بویژه جناب آقای دکتر اردلان که علاوه بر سمت استادی همواره مشوق اینجانب در این امر بود و راه مرا برای پیشرفت ونیل به ترقیات عالیهتری باز نموده و در تدوین این پایان نامه نیز زحمت راهنمایی و هدایت آنرا تقبل فرموده اند سپاسگذاری مینمایم هم چنین از آقای دکتر نشاطدانشیار دانشور و آقای دکتر قزوینیان رئیس درمانگاه کرسی بازرسی مواد غذایی و آقای دکتر فرخنده و از کلیه کارکنان کرسی میکروبیولوژی که در تکمیل وسائل کار از هیچگونه بذل توجهی کوتاهی نفرموده اند تشکر مینمایم .

موضوع این پایان نامه **مقایسه روشهای مختلف کلی متری در شیر است و برای آن يك مقدمه و پنج بخش و يك نتیجه** قرارداد شده است.

مقدمه

شك نیست که یکی از امور تمدن بشریت بهداشت است. سازمانهای بهداشتی نه تنها در کلیه ملل متمدنه بلکه در ممالک عقب افتاده نیز سالهاست که تشکیل شده و بسرعت روبه تکامل میرود و دلیل آنهم کاملاً واضح است زیرا به این مطلب پی برده اند که تأمین سلامتی افراد از طریق بوجود آوردن شرائط بهداشتی بمراتب سهلتر و ارجح از روش درمانی است.

يك موسسه بهداشتی هر قدر هم که كوچك باشد لااقل در يك یا چند مورد میتواند با صرف كمترین هزینه و يك عمل ساده از اشاعه بیماریها و ابتلاء افراد يك شهر و بلکه يك مملکت جلوگیری نماید در صورتیکه يك مؤسسه درمانی هر قدر هم مجهز بوسائل لازم باشد فقط شاید بتواند افراد معدودی را که بعلت عدم وجود بهداشت بیمار شده اند با صرف هزینه های گزاف و تحمل مشقات بسیار درمان نماید بنا بر این اصل مسلم راه عاقلانه همین است که بجای اینکه منتظر باشیم افراد بیمار شده و سپس آنها را درمان نمائیم کاری کنیم که از ابتلاء آنها به بیماری ممانعت بعمل آید. این عمل نه تنها از لحاظ بهداشت صحیح است بلکه از نظر اقتصادی نیز مقرون بصر فیه و صلاح هر ملت و مملکت میباشد. طرق تأمین بهداشت زیاد و روز بروز نیز بر تعداد آن افزوده میگردد یکی از این طرق بازرسی مواد غذایی است که میتوان گفت سرمنشاء تمام روشهای مختلف تأمین بهداشت است چه تمام افراد بشر روزانه به غذا احتیاج داشته و نیروی موتور بدن خود را از آن تأمین مینمایند غذای فاسد و آلوده نه تنها این نیرو را تأمین نمینماید بلکه انسان را بمقابله انواع بیماریهای گوناگون عفونی و مسمومیت های غذایی مینماید.

برای تأمین بهداشت مواد خوراکی در سراسر جهان همواره متخصصین فن با وسائل گوناگون در تلاش بوده و دائماً کوشش مینمایند راه و رسم بهتری را پیدانمایند.

مسلم است مهمترین ماده غذایی که میتوان گفت اولین و آخرین غذای بشر میباشد همان شیر است که مشتقات زیادی نیز از آن بوجود میآید . این ماده غذایی امروزه بقدری اهمیت پیدا نموده که علاوه بر اینکه غذای قطعی اطفال و بیماران است کلیه دانشمندان ذی فن جهان متفقاً نوشیدن آنرا برای کلیه افراد از هر طبقه و در هر سن لازم و واجب و یکی از شروط اصلی تأمین نیروی بدن و ادامه حیات دانسته اند زیرا شیر نه تنها کلیه مواد غذایی و املاح آلی و معدنی لازم برای بدن را دارا میباشد بلکه تقریباً سرشار از تمام ویتامینهای مفید برای بدن نیز هست بنا بر این جای شك و تردیدی باقی نمیماند که به همان نسبت که اهمیت آن از سایر مواد غذایی بیشتر است به همان نسبت نیز باید بیشتر مورد توجه خاص قرار گیرد بدینجهت است که سازمان بهداشت جهانی در این مورد توجه خود را بیشتر مبذول داشته و به ممالک عقب افتاده کمکهای شایان مالی (از لحاظ تهیه وسایل اولیه بهداشتی مانند کارخانه پاستوریزاسیون شیر . وسایل آزمایشگاهی وغیره) و معنوی (تربیت واعزام متخصصین تشکیل کنفرانسهای بهداشتی وغیره) مینماید . در کنترل و بازرسی بهداشتی شیر دو قسمت مشخص وجود دارد : یکی بررسی شیمیائی شیر بمنظور تعیین کیفیت و کمیت اجزاء متشکله آن مانند تعیین مقدار چربی تعیین اسیدیته و کشف تقلباتی که میشود وغیره و دیگری بررسی میکروبیولوژی شیر که اهمیت آن از قسمت اول بمراتب بیشتر است زیرا شیری که چربی آنرا گرفته باشند و یا آب داخل آن نموده باشند چندان ضرری بمصرف کننده وارد نمیآورد در صورتیکه شیری که آلوده به میکرب باشد برای مصرف کننده خطرناک و موجب ابتلاء بیماری است .

در آزمایش باکتریولوژی شیر دو مبحث وجود دارد یکی تعیین کلی تعداد میکربها و دیگری تعیین تعداد کلی باسیلهای شیر بخصوص کلی نوع يك که اهمیت فوق العاده از لحاظ اشاعه بیماری داشته و مخصوص به روده های انسان است ، وجود کلی باسیلها و بالخصوص کلی نوع يك به ما میفهماند که شیر آلوده به سایر میکربهای دیگر که در روده انسان ممکن است وجود داشته باشند مانند سالمونلاها عامل دیسنتری حصبه وغیره میباشد اینجانب برحسب عقیده شخصی خودم که انسان باید در هر مقام و مرتبه

که هست وجودش منشاء اثری برای هموعان خود بوده و خدمتگذار خلق باشد
بررسی مقایسه روشهای مختلف کلی متری را در شیر که اهمیت حیاتی
آن برای کلیه افراد بشر همانطور که اشاره شد واضح و مبرهن است با وجود
مشکلات زیاد بعهده گرفته و مصمم است که بهترین راهی را که ممکن است
برای نیل به مقصود آسانتر و مطمئنتر باشد پیدا نموده و بهم گنان خود عرضه
دارم گرچه این خدمت ناقابل در قبال زحمات شبانه روزی اساتید و بزرگان
فن آنقدر ناچیز و بی اهمیت است که به پیشیزی نیرزد ولی از آنجا که خدمت
هر کس همان است که از دست و توانائی او برمیآید امید است که مورد قبول
اربابان اهل فن قرار گیرد و از خداوند متعال مسئلت دارم که حقیر را در این
امریاری فرماید

بخش اول تعریف کلی فرمها

این دسته میکربها از خانواده *Enterobacteriaceae* بوده و وجه تمایز آنها از سایر باکتریهای این خانواده اینستکه لاکتوز را تخمیر نموده و تولید گاز میمایند بعضی از آنها دارای ساختمان پادگنی مخصوص بوده و بیماریزا میباشند در صورتیکه عده دیگر غالباً بی آزار و فقط در چند مورد سویه های خاصی از آنها بعنوان عامل عفونت دستگاههای ادراری تناسلی و تنفس در انسان و دام جدا کرده اند.

کلی فرمها بطور کلی میکربهایی هستند هوازی و غیرهوازی اختیاری که لاکتوز را تخمیر نموده و تولید گاز مینمایند رنگ گرام را بخود نگرفته و تولید هاگک نمینمایند اندازه آنها نه تنها در شرائط مختلف بلکه حتی در یک محیط کشت نیز تغییر میکنند بعضی از ارقام آنها متحرک و عده دیگر بیحرکتند ولی عموماً فاقد کپسول میباشند حرارت مطبوع آنها ۳۷ درجه است ولی با اختلاف نسبت کم و بیش زیادی نیز رشد میکنند بطوریکه در شیر از حرارت ده درجه رشد آنها شروع میگردد و تا حرارت ۴۴ درجه ادامه دارد کشت آنها در محیطهای عادی بخوبی انجام گرفته در آبگوشت پس از ۱۲ - ۱۸ ساعت تیره گی یکنواختی را بوجود میآورد که پس از مدتی پرده شکننده بر سطح محیط ایجاد نموده و بعداً در ته ظرف رسوب مینماید. در روی ژلاتین پرگنهها ظریف سفید مایل به آبی و براق است ولی هیچگاه ژلاتین را ذوب نمینماید. در محیطهای اختصاصی مانند *EMB* و *Desoxycholate* و غیره که حاوی مواد رنگی متوقف کننده رشد برای سایر میکربهاست پرگنههای کلی فرم پس از ۱۸ - ۲۴ ساعت بر رنگ قرمز تیره تا بنفش سیاه رنگ دیده میشود که کاملاً صاف و نرم و مرطوب بوده و محدب بشکل عدسی است.

مقاومت میکرب در برابر خشکی و مواد گندزدا زیاد است ولی معمولاً در حرارت پاستوریزاسیون از بین میروند بدینجهت وجود آنها در شیر پاستوریزه دلیل بر آلودگی ثانوی و یا نقص فنی در عملیات پاستوریزاسیون میباشد ناگفته نماند که سویه های معدودی که هنوز شناخته نشده در حرارت پاستوریزاسیون

نیز مقاومت مینمایند ولی خوشبختانه تعداد آنها کم و از انواع بی اهمیت بوده و بندرت دیده میشوند.

نامگذاری کلی فرمها - سابقاً میکربهای دسته *Escherichia* و *Aerobacter* را کلی فرم میدانستند و بعداً آنها را بسه نوع بشرح زیر تقسیم بندی نمودند :

- ۱- نوع *Escherichia* که در روده انسان و دامهاست .
- ۲- نوع *Aerobacter* که گاهی در روده انسان و حیوانات دیده میشود .
- ۳- نوع *Klebsiella* که در دستگاههای تنفس و ادراری تناسلی دیده میشود .

ولی تعریفی که با طبقه بندی میکربشناسی بیشتر مطابقت داشته و عملی تر است و عموماً مورد قبول میکربشناسان قرار گرفته اینست که کلی فرمها باسیلهائی هستند هوازی و غیرهوازی اختیاری بدون هاگ گرام منفی که لاکتوز را تخمیر نموده و تولید گاز مینمایند.

نامگذاری کلی فرمها یکبار در شیر یافت میشوند مسئله ایست دشوار که حتی برای متخصصین مربوطه نیز خالی از اشکال نیست . آخرین پیشنهاد مربوط به طبقه بندی و نامگذاری کلی فرمها در سال ۱۹۵۶ بوسیله سو کمیسون کلی آگرژن از اجتماع باکتریولوژیست ها در لندن انجام گرفته است .

اعضاء این کمیسیون عبارتند از : **Windle Taylor** .

Joan Taylor . Lovell . Cowon . Clegg .

Cuthbert . Thomas . Jacobe .

موضوع جالب توجه در پیشنهاد این دسته از محققین اینست که نام هر نوع میکرب همراه یک کلید **Clf de determination** تعیین میگردد که در حقیقت همان کلیدی است که در سال ۱۹۳۵ بوسیله **Wilson** در کتاب مهم او تحت عنوان **Bacteriological grading of milk** پیشنهاد شده است . این کلید بعدها بوسیله تمام محققینی که درباره کلی فرمهای شیر مطالعه نموده اند مورد استفاده قرار گرفته است بدین ترتیب این نامگذاری اخیر معادل اسامی را که در سیستم ویلسون پیشنهاد شده تعیین و اجازه میدهد که تمام کارهایی که در باره میکربهای کلی فرم شیر انجام میشود از روی جدول زیر که در حقیقت از روی خواص میکرببیلژی انواع کلی فرمها تدوین شده است بطور واضح و روشن مطالعه و انجام گردد .

نامگذاری دسته کلی آژروئن - گزارش سوکمیته آژروئن
 در سال ۱۹۵۶ در اجتماع باکتریولوژی آبلیمکه در لندن

واکنش

نامگذاری

اندل	میتلرود	VP	ستیرات	رنگ در ۳۰ درجه	ژلاتین	نام علمی	نام توصیفی	نام اختصاری
+	+	-	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Indole + 44° +)	E. Coli I
-	+	-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Indole -)	E. Coli II
+	+	-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Indole + 44° -)	E. Coli III
-	+	-	+	-	-	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	C. freundii I
+	+	-	+	-	-	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i> (Indole +)	C. freundii II
-	-	+	+	-	-	<i>klebsiella aerogenes</i>	<i>klebsiella aerogenes</i>	K. aerogenes I
+	-	+	+	-	-	<i>klebsiella aerogenes</i>	<i>klebsiella aerogenes</i> (Indole +)	K. aerogenes II
-	-	+	+	+	+	<i>klebsiella cloacae</i>	<i>klebsiella cloacae</i>	K. Cloacae

اهمیت وجود کلی فرمها در شیر

۱- وجود کلی فرمها در شیر خام که بطریق معمولی تهیه میشود موضوعی است که کاملاً طبیعی زیرا این میکربها در حال عادی در امعاء انسان و حیوانات و هم چنین در زمین گاه علوفه دانه‌های خوراکی دیده میشوند بنا بر این آلوده شدن شریکه با دست دوشیده میشود موضوعی است اجتناب ناپذیر

این میکربها با وجودیکه غالباً بی‌آزار هستند معذک سویه‌های مختلفی بعنوان عامل بیماری‌های اسهال سقط جنین عفونت دستگاههای ادراری تناسلی و ورم پستان جدا نموده اند مانند سویه‌های O128: B8, O86: B7 و O26: B6 و O55: B5 و O119: B14, O128: B12 و O111: B4 و O15: B15 و O126: B16 و O124: B17 که همواره در نوزاد انسان تولید اسهالهای شدید و خطرناک مینماید و حتی طبق آزمایش Ferguson در سال ۱۹۵۳ خوراکنیدن سویه O55: B5 با شخص بالغ نیز موجب عوارض معدی و معوی گردیده است بنا بر این وجود کلی فرمها در شیر از لحاظ ایجاد بیماری خالی از خطر نیست.

۲- کلی فرمها بعلمت اینکه از لحاظ حرارت میدان وسیعی برای رشد خود دارند و در فاصله درجات ۱۰ تا ۴۴ درجه سانتیگراد قادر بر رشد و تکثیر میباشند لذا در گرمای معمولی هوا بسرعت در شیر رشد نموده و در اثر فرما تناسیون لاکتوز تولید اسید لاکتیک نموده و باعث انعقاد شیر میگردد بعلاوه از خود زهرا به ترشح مینمایند که در صورت زیاد بودن آن ممکن است خطراتی را تولید بنماید همچنین ایجاد مواد دیگری نیز مینمایند که بوی شیر را نامطبوع می‌سازند.

در صنعت کره گیری و پنیر سازی که از خاصیت تخمیر لاکتوز برای تهیه مواد مذکور استفاده میشود فرما نتاسیون لاکتوز بوسیله دسته کلی باسیل ها تولید کره و پنیر نامطبوعی را مینماید که از لحاظ طعم و جنس قابل مصرف نیست .

۳- وجود کلی فرم در شیر به ما اعلام میدارد که شیر آلوده به سایر میکربها نیز میباشد و در حقیقت سنجش وجود کلی فرم در شیر معیاری از میزان آلودگی کلی آن است زیرا همانطور که قبلا اشاره شد این میکربها در مدفوع انسان و حیوانات و خاک وجود داشته و آلوده شدن شیر به این میکرب دلیل باری بر وجود سایر میکربها مانند سالمونلاها- عامل دیسانتری- حصه و غیره نیز میباشد از این جهت میتوانیم با تعیین وجود کلی فرم در شیر و تعداد آنها اعلام داریم که شیر تا چه حد آلوده است و در صورتیکه در شیر خامی کلی فرم دیده نشود دلیل برای نسیستکه شیر مزبور با رعایت کامل نکات بهداشتی تهیه شده است

۳- در شیر پاستوریزه معمولا کلی فرم نباید دیده شود زیرا حرارت پاستوریزاسیون آنها را از بین میبرد . وجود کلی فرم در شیر پاستوریزه دلیل برای نسیستکه یا حرارت کافی برای پاستوریزاسیون به شیر داده نشده است که این مطلب با آزمایش فسفاتاز روشن میشود و یا لوله های مسیر راه شیر از پاستوریزاتور به بعد و مخزن جمع آوری شیر آلوده است و یا اینکه شیشه های ظروف شیر بخوبی استریل نگردیده اند و بالاخره ممکن است آلودگی ثانوی ایجاد شده باشد از این جهت همواره آزمایش شیر از لحاظ تعیین وجود کلی فرم مورد توجه خاص قرار گرفته است

کلی متری و اهمیت آن در بازرسی شیر

کلی متری عبارتست از شمارش باکتریهای کلی فرم .
برای اینکار از روشهاییکه برای شمارش کلیه میکربهای دیگر متداول است استفاده مینمایند درحین عمل باید شرائطی بوجود آورد که حتی المقدور از رشد میکربهای دیگر موجود در شیر جلوگیری شود این شرائط کشت باید طوری باشد درعین حال که از رشد میکربهای دیگر ممانعت مینماید برای رشد کلی فرمها مساعد باشد .

میکربهاییکه باید از رشد آنها جلوگیری شود عبارتند از گرام مثبتها و مخمرها وسایر میکربهای غیر کلی فرم که قادر به تخمیر لاکتوز میباشند .
برای اینکار از محیطهای انتخابی **Selective** استفاده مینمایند . اساس این محیطها عبارت از مواد متوقف کننده است که برای رشد میکربهای غیر کلی فرم مضر بوده و مانع رشد آنها میگردد در بعضی از روشهای شمارش کلی فرمها از درجات حرارتی استفاده مینمایند که برای رشد میکربهای غیر کلی فرم مساعد نیست ولی این روش بیشتر بمنظور جستجوی انواع کلی فرمها و در مورد آب بکار برده میشود .

(بطوریکه بعداً خواهد آمد اینجا در آزمایشات خود تاحدی از این روش استفاده نموده و نتایج نیکویی بدست آورده ام)

باید متذکر شد که در این مبحث تعیین انواع کلی فرمها و مختصات آنها مورد نظر ما نبوده و منظور ما فقط تعیین تعداد کلی کلی فرمها میباشد .
همانطور که قبلاً اشاره گردید معمولاً در شیر خام وجود کلی باسیلها بعلت آلودگی هائی که نسبت آن بستگی به شرائط دامداری و طرز دوشیدن و نگاهداری شیر و بهداشت عاملین دارد حتمی و امری است تقریباً اجتناب ناپذیر ولی موضوع قابل اهمیت تعداد آنهاست زیرا این دسته از میکربها (باستثناء عدده معدودی در موارد خاص) بیماریزا نبوده و در صورتیکه تعداد آنها کم باشد خطرناک نمیباشند بدینجهت باید حتی المقدور کوشش نمود که تعداد آنها را در یک حد نگاهداشته و از ازدیاد آنها جلوگیری نمود و در اینصورت است که مقدار کم آنها در شیر موجب تغییری نمیکردد ولی در صورتیکه تکثیر یابند موجب فرماتاسیون لاکتوز شیر و فساد آن خواهند شد .