درسنامه

آزمایشگاه
میکرب شناسی پزشکی

تالیف وترجمه

گروه میکرب شناسی

دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

مهر ماه ۱۴۰۳

هُوَ الْحَکِیمُ الْعَلِیمُ

جهان را بلندی و پستی تویی
ندانم چه ای، هر چه هستی تویی

با مشارکت:

دکتر محمد مهدی فیض آبادی، دکتر فرهاد بنکدار هاشمی، دکتر فرشته جبل عاملی، دکتر شادی شاهسوان، دکتر عباس بهادر، دکتر محمد ایمان عینی، دکتر رضا بیگ وردی، دکتر نرگس نوده فراهانی، دکتر شهناز حلیمی و دکتر کاوه صادقی

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه
جلسه اول ۷
مراحل تشخیص عامل بیماری عفونی ۷
مرحله پیش تحلیلی (Pre-Analytical) ۹
نکات مهم در جمع آوری نمونه: ۱۰
انتقال نمونه: ۱۳
دریافت نمونه و مشاهده مقدماتی ۱۵
شاخص‌های بازگرداندن نمونه‌های بالینی (Specimen Rejection) ۱۶
آنالیز نمونه‌ها (Analytic phase) ۱۷
استریلیزاسیون و ضدعفونی کردن:(Sterilization and Disinfection) ۱۷
روش‌های استریلیزاسیون: ۱۷
الف: روش‌های فیزیکی ۱۷
استریل کردن جهت پریون ها: ۲۲
روش‌های ضدعفونی کردن: ۲۲
ب: روش‌های شیمیایی ضدعفونی کردن ۲۳
فنل‌ها (کربولیک اسید): ۲۵
جلسه دوم: روش‌های مطالعه میکربشناسی نمونه‌های بالینی ۲۶
الف- میکربیولوژی ملکولی ۲۷
ب -روش Mass Spectrometry ۲۷
ج-روش کشت ۲۸
روش‌های میکروسکوپی ۲۸
رنگ آمیزی گرم: ۲۹
الف-تهیه گسترش ۲۹
تهیه نمونه از محیط کشت جامد و مایع ۳۰
تهیه گسترش از محیط جامد ۳۱
د-مراحل رنگ آمیزی گرم ۳۱
مشاهده با میکروسکوپ نوری ۳۲
اشکال و آرایش باکتری‌ها ۳۲
رنگ آمیزی ساده: ۳۳
رنگ آمیزی اختصاصی: ۳۳
رنگ آمیزی مقاوم به اسید (Acid fast staining) ۳۳
رنگ آمیزی مقاوم به اسید به روش زیل نلسن (Ziehl and Neelsen) ۳۴
رنگ آمیزی فونتانا(Fontana staining) ۳۴
رنگ آمیزی آلبرت (Albert staining) ۳۴
رنگ آمیزی ورمالاشیت(Malachite green staining) ۳۵
جلسه سوم: کشت باکتری‌ها ۳۶
انتخاب محیط‌های کشت مناسب ۳۷
انواع محیط‌های کشت : ۳۷
روش‌های کشت نمونه بالینی: ۳۸
کشت به روش ایزولاسیون بر روی محیط کشت آگار ۳۸
کشت جهت شمارش کلنی‌ها بر روی محیط آگار: ۳۹
کشت در لوله‌های حاوی محیط کشت: ۴۱

کشت در لوله حاوی محیط مایع ۴۱
کشت در لوله حاوی محیط جامد شیب دار (Slant): ۴۲
کشت در لوله حاوی محیط نیمه جامد (Semisolid) ۴۳
دما، اتمسفر و رطوبت مناسب جهت رشد باکتری‌ها ۴۳
تفسیر نتایج کشت: ۴۴
مشخصات ماکروسکوپی کلنی: ۴۴
شکل کلنی‌ها: ۴۴
واکنش باکتری‌ها در محیط های کشت ۴۵
همولیز روی محیط بلاد آگار ۴۵
تولید پیگمان (رنگدانه) در محیط آگار: ۴۶
تغییرات در محیط‌های افتراقی: ۴۷
جلسه چهارم: شناسایی باکتری‌ها(کوکسی‌های گرم مثبت) ۴۸
باکتری‌های گرم مثبت: ۴۹
کوکسی‌های گرم مثبت: ۵۰
Error! Bookmark not defined. .....
آزمایش کاتالاز: ۵۴
هدف: ۵۴
پایه و اساس آزمایش: ۵۴
روش کار: ۵۴
محدودیت‌ها: ۵۴
نتیجه: ۵۵
آزمایش حساسیت به باسیتراسین: ۵۵
هدف: ۵۵
پایه و اساس آزمایش: ۵۵
محدودیت‌ها: ۵۶
نتیجه: ۵۶
آزمایش کواگولاز: ۵۶
پایه و اساس آزمایش: ۵۷
روش کار آزمایش کواگولاز آزاد: ۵۷
محدودیت‌ها: ۵۷
نتیجه: ۵۷
آزمایش همولیز: ۵۷
پایه و اساس آزمایش: ۵۸
روش کار: ۵۸
محدودیت‌ها: ۵۹
نتیجه: ۵۹
غیر همولتیک (NonHemolytic): ۵۹
آزمایش کمپ (CAMPT test) ۵۹
هدف: ۵۹
پایه و اساس: ۶۰
روش ۶۰
نتیجه ۶۰
محدودیت‌ها: ۶۰
حساسیت به اپتوچین (Ethyl hydrocupreine hydro chloride) ۶۰

آزمایش بایل اسکولین: ۶۲
آزمایش تحمل نمک: ۶۳
جلسه پنجم: بررسی سنجش حساسیت باکتری بیماری‌زا نسبت به داروهای ضدمیکربی (آنتی بیوگرام) ۶۴
استاندارد کردن آزمایش‌های حساسیت ضدمیکربی ۶۵
۱-روش انتشار از دیسک (روش Kirby-Bauer) ۶۶
الف- مراحل انجام آزمایش انتشار از دیسک: ۶۶
ب- تعیین تقریبی تعداد باکتری موجود در سوسپانسیون: ۶۶
ج- کشت سوسپانسیون روی محیط کشت مناسب: ۶۷
د- دیسک گذاری: ۶۸
ه- انکوباسیون: ۶۹
و- تفسیر نتایج: ۷۰
2- روش رقت سازی متوالی ۷۱
۳- روش انتشار گرادیانت: ۷۱
جلسه ششم: کشت ادرار ۷۳
جمع آوری نمونه ادرار برای کشت: ۷۳
الف-نمونه ادرار میانی (Midstream urine): ۷۴
ب -جمع آوری نمونه ادرار از کاتتر (Catheter Collection): ۷۴
ج - جمع آوری نمونه ادرار از مثانه(Supra pubic Aspiration): ۷۵
کشت نمونه‌های ادراری: ۷۵
آزمایش غربالگری برای پیوریا (Pyuria) ۷۷
جلسه هفتم : باسیل‌ها و کوکوباسیل‌های گرم منفی ۷۸
کشت در محیط مک کانکی آگار (Maccankey Agar) ۷۹
آزمایش اکسیداز : ۸۱
پدیده سوارمینگ (Swarming pHenomenon): ۸۲
کشت در محیط کلیگلرآیرون آگار(KIA): ۸۳
کشت در محیط SIM: ۸۵
آزمایش حرکت: ۸۶
آزمایش MR_VP: ۸۷
آزمایش VP : ۸۸
آزمایش استفاده از سیترات: ۸۹
آزمایش اوره آز: ۹۱
جلسه هشتم: شناسایی باسیل‌های گرم منفی ۹۵
جلسه نهم:مرور مطالب تمامی جلسات ۹۶
جلسه دهم: آزمون پایان ترم ۹۷

قوانین آزمایشگاه میکرب شناسی پزشکی

۱. ساعت حضور در آزمایشگاه **رأس** ساعت اعلام شده در برنامه آموزشی می‌باشد.

۲. در صورت وجود زخم و بریدگی در دست‌ها، بیماری‌هایی از قبیل کور رنگی و مشکلات سیستم ایمنی قبل از شروع کار، به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید.

۳. پوشیدن روپوش سفید جهت پیشگیری از آلودگی لباس‌ها الزامی می‌باشد.

نکته: به منظور جلوگیری از انتشار آلودگی‌های احتمالی، از قرار دادن روپوش در کنار سایر لوازم شخصی خودداری فرمایید و به طور مرتب، جداگانه و با محلول ضدعفونی کننده همچون هیپوکلریت سدیم (با نام تجاری وایتکس و...) بشوئید.

۴. به همراه داشتن کپی کارت دانشجویی جهت کارت گزارش کار الزامی است.

۵. وسایل شخصی (کیف، کتاب، عینک، ساعت، گوشی همراه و...) خود را روی میز کار که احتمال آلودگی آن‌ها زیاد است، قرار ندهید.

۶. در آزمایشگاه میکرب شناسی از خوردن، آشامیدن، دست زدن به سر و صورت (بینی، چشم، گوش و دهان) اکیداً خودداری فرمائید.

۷. چنان چه در هر مرحله از کار، محیط کشت و یا سوسپانسیون میکربی شکسته و یا قطراتی از آن سبب آلودگی میز، لباس و دست‌ها شود، به منظور جلوگیری از انتشار آلودگی، بلافاصله مسئول گروه یا آزمایشگاه را مطلع کرده تا تصمیمات مناسب اتخاذ شود.

۸. گزارش کار هر جلسه را به طور خلاصه در کارت گزارش کار منعکس کرده، در حفظ آن تا پایان دوره کوشا باشید.

۹. قبل از خروج از آزمایشگاه شیر گاز را بسته، میز کار را تمیز نموده، عدسی میکروسکوپ (خصوصاً عدسی با درشت نمایی ۱۰۰) را با کاغذ مخصوص پاک نموده، ظروف رنگ آمیزی را در جای خود قرار داده و از بسته بودن درپوش آن‌ها اطمینان داشته باشید.

۱۰. مواد و لوازم آلوده در آزمایشگاه میکرب شناسی فقط در ظروف خاص جمع آوری شده و استریل می‌گردند، بنابراین از دور ریختن این وسایل و مواد در سطل‌های معمولی جداً خودداری فرمایید.

۱۱. قبل از ترک آزمایشگاه حتماً دست‌های خود را بشوئید.

۱۲. غیبت (موجه و غیرموجه) حداکثر یک جلسه می‌باشد و دانشجویانی که غیبت بیشتری داشته باشند، اجازه حضور در امتحان این درس را نخواهند داشت .

جلسه اول

روند تشخیص بیماری‌های عفونی پیچیده است. پزشک متخصص ممکن است بر اساس سابقه بیماری، علائم، بررسی‌های فیزیکی و اطلاعات اپیدمیولوژی قادر به تشخیص کلینیکی بیماری باشد.

اما تشخیص عامل بیماری عفونی ممکن است خیلی مشکل تر بوده و وابسته به تهیه نمونه ای با کیفیت قابل قبول، انتقال در شرایط صحیح و نتایج آزمایشات یک آزمایشگاه میکربیولوژی بالینی می‌باشد. علائم ناشی از بیماری‌ها با عوامل مختلف می‌توانند همپوشانی داشته باشندو همچنین یک روند عفونی می‌تواند اندام‌های گوناگونی را درگیر کند، بنا براین جهت درمان ، نیاز به تشخیص عامل اصلی بیماری عفونی و استفاده ازآنتی بیوتیک‌های مؤثر می‌باشد.

در واقع عدم تشخیص دقیق و به موقع عامل بیماری، منتج به درمان تجربی می‌شود و یا در مواردی مانند بیماری با چند عامل میکربی و ... باعث طولانی شدن درمان شود.

درمان تجربی احتمال واکنش‌های دارویی نامطلوب ، تغییر میکربیوم بیماران و انتخاب میکرب‌های جهش یافته ی مقاوم را افزایش داده که به روش غیر مستقیم می‌تواند سلامت بیماران را به خطر بیندازد.

چنین آسیب‌های جانبی تأکیدی بر لزوم آزمایشات دقیق و سریعی جهت تشخیص عامل بیماری می‌باشد.

خوشبختانه امروزه ابزار زیادی برای مبارزه با بیماری‌ها در اختیار بشرمی‌باشد که هم چنان در حال پیشرفت است و سبب شده است که عوامل میکربی با سرعت بیشتر تشخیص داده شوند. البته هنوز هم روش‌های قدیمی مانند کشت و شناسایی برای برخی (نه بیشتر)از باکتری‌ها بااهمیت می‌باشد.

در ارائه این واحد درسی، تلاش شده است دانشجویان گرامی با روند کامل بررسی عامل میکربی آشنا گردند.

مراحل تشخیص عامل بیماری عفونی

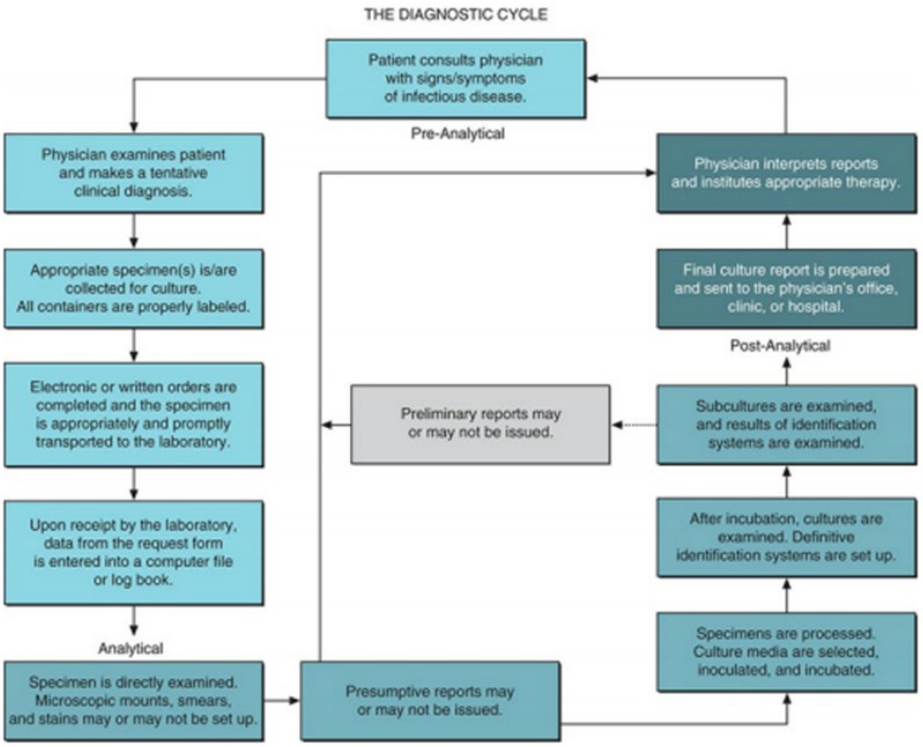
ارزیابی آزمایشگاهی نمونه بالینی شامل ۳ مرحله می‌باشد(شکل۱-۱،شکل۲-۱):

الف:مرحله پیش تحلیل (Pre Analytical)

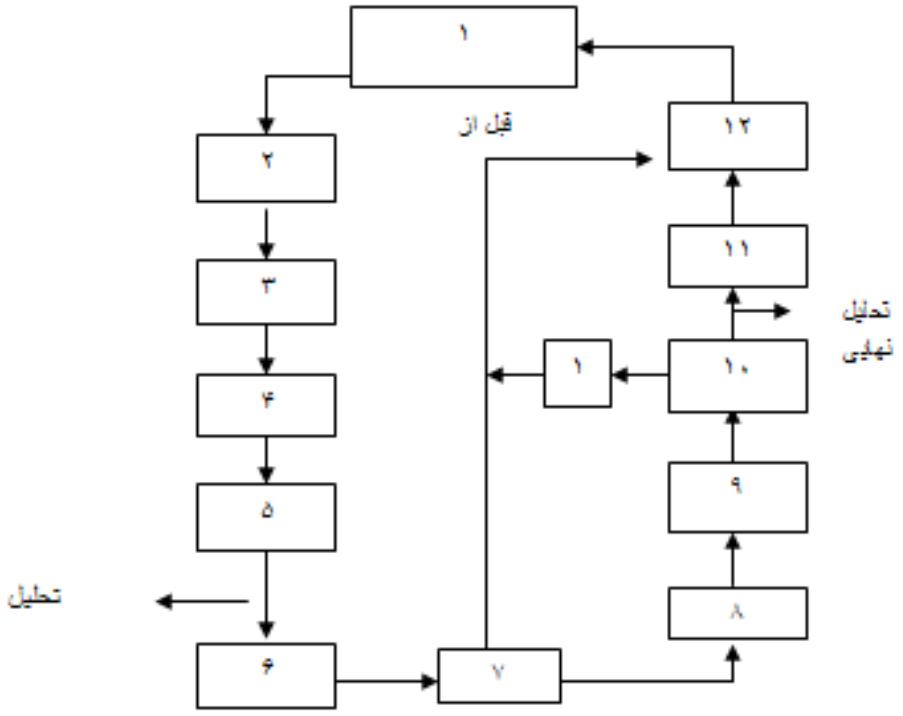
ب:مرحله تحلیل (Analytical)

ج:مرحله پسا تحلیل (Post Analytical)

جهت رسیدن به نتیجه مطلوب دقت در هر یک از این مراحل ضروری و حائز اهمیت می‌باشد.



شکل ۱-۱ مراحل تشخیص بالینی و آزمایشگاهی بیماری‌های عفونی



شکل ۲-۱ مراحل تشخیص بالینی و آزمایشگاهی بیماری‌های عفونی

۱- مشاوره بیمار با پزشک و ارائه علائم و نشانه‌های بیماری عفونی

۲- معاینه بیمار توسط پزشک و تشخیص بالینی تجربی

۳- تهیه نمونه یا نمونه‌های مناسب ،به طوری که تمام نمونه‌ها دارای برچسب مشخصات باشند

۴- درخواست آزمایشات به صورت دست نویس یا الکترونیکی و انتقال نمونه‌ها به روش صحیح

۵- پذیرش نمونه توسط آزمایشگاه و ثبت داده‌ها بر اساس برگه درخواست ارسالی در یک فایل رایانه ای یا یک دفتر

۶- آزمایش مستقیم نمونه

۷- گزارشات احتمالی به پزشک در صورت امکان

۸- بررسی نمونه‌ها (انتخاب محیط‌های کشت، تلقیح نمونه‌ها و گرما گذاری)

۹- بررسی محیط‌های کشت و شناسایی بر اساس دستور عمل آزمایشگاه

۱۰- بررسی محیط‌های کشت و آزمایشاتی که جهت شناسایی انجام شده است

۱۱- تهیه گزارش نهایی کشت و ارسال به پزشک (کلینیک یا بیمارستان)

۱۲- تفسیر گزارشات توسط پزشک و درمان مناسب

۱۳- گزارش اولیه (در صورت امکان)

مرحله پیش تحلیلی (Pre-Analytical)

۱- مشاوره بیمار با پزشک و ارائه علائم و نشانه‌های بیماری عفونی

۲- معاینه بیمار توسط پزشک و تشخیص بالینی تجربی

۳- نمونه برداری:

در بررسی عامل بیماری عفونی باید نمونه‌های مختلفی جهت کشت میکربی، مطالعات سرولوژیک و یا بررسی ملکولی تهیه شود.

جمع آوری نمونه صحیح و مناسب و انتقال آن در شرایط صحیح از مراحل بسیار مهم و مؤثر در تشخیص عامل بیماری می‌باشد.

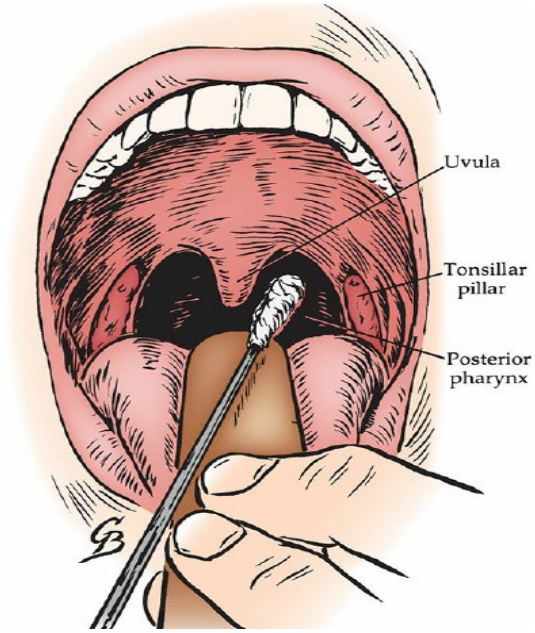
یک نمونه نامناسب سبب عدم شناسایی عامل اصلی عفونت ، شناساندن یک باکتری کومنسال یا آلوده کننده به عنوان عامل عفونت ودر نهایت منجر به درمان نادرست و حتی مضر برای بیمار می‌شود.

نکات مهم در جمع آوری نمونه:

۱- نمونه باید از محل واقعی عفونت با حداقل آلودگی تهیه شود.

برای مثال در بررسی عفونت استرپتوکوکی حلق، باید سواب فقط در تماس با لوزه‌ها و بخش پشتی حلق باشد و با سایر قسمت‌های دهان و بزاق تماسی نداشته باشد. چون در این نواحی به طور طبیعی باکتری‌های زیادی ساکن هستند و سبب عدم شناسایی صحیح عامل عفونت و شکست درمانی می‌شود(شکل۳-۱).

مثال‌های دیگر می‌توانند وجود باکتری‌های ساکن بافتPerurethral (اطراف پیشابراه)وPerineum (پرینه) قبل از جمع آوری ادرار در خانم‌ها، آلودگی نمونه Endometrial با ترشحات واژن و .... باشد.



شکل۳-۱: نمونه برداری از حلق توسط سواب استریل

۲- زمان مناسب جمع آوری، درهر نمونه برداری در نظر گرفته شود. برای تعیین این زمان Naturalhistory (سیر بیماری) و Pathophysiology بیماری عفونی اهمیت زیادی دارند.

برای مثال در بیماری تیفوئید (حصبه) در طی هفته اول می‌توان باکتری را از کشت خون جداسازی نمود در حالی که در هفته دوم و سوم باکتری از نمونه مدفوع و ادرار بهتر جداسازی می‌شود.

مثال دیگر نامناسب بودن جمع آوری نمونه‌های **۲۴** ساعته جهت کشت باکتری می‌باشد که به علت افزایش احتمال آلودگی و رشد باکتری‌های همزیست نتایج صحیحی نخواهند داشت (مثال نمونه ۲۴ ساعته ادرار و خلط).

۳- مقدار نمونه‌های آزمایشات درخواستی کافی باشد. نمونه‌های کم ممکن است منجر به عدم تشخیص عامل عفونت شود.

برای مثال به همین جهت بر روی محیط‌های کشت خون مقدار لازم برای تزریق خون به محیط ثبت شده است.

۴- استفاده از ابزار مناسب نمونه برداری، ظروف نمونه ، محیط‌های کشت و انتقال بسیار مهم می‌باشد. ظروف نمونه باید استریل بوده، استفاده از آن آسان باشد، درب آن‌ها کاملاً بسته شده و هیچ گونه نشتی وجود نداشته باشد.

شکل۴-۱ : پلیت سمت چپ تصویر مربوط به نمونه برداری توسط سرنگ می‌باشد

وپلیت سمت راست مربوط به همان نمونه ،ولی برداشت توسط سواب

سواب‌ها ابزار متداولی برای جمع آوری نمونه‌ها جهت کشت باکتری‌ها می‌باشند .البته در مواردی که امکان آسپیراسیون ترشحات توسط سرنگ یا برداشت بافت ممکن باشد ،بهتر است ازاین ابزاراستفاده شود(شکل۴-۱).

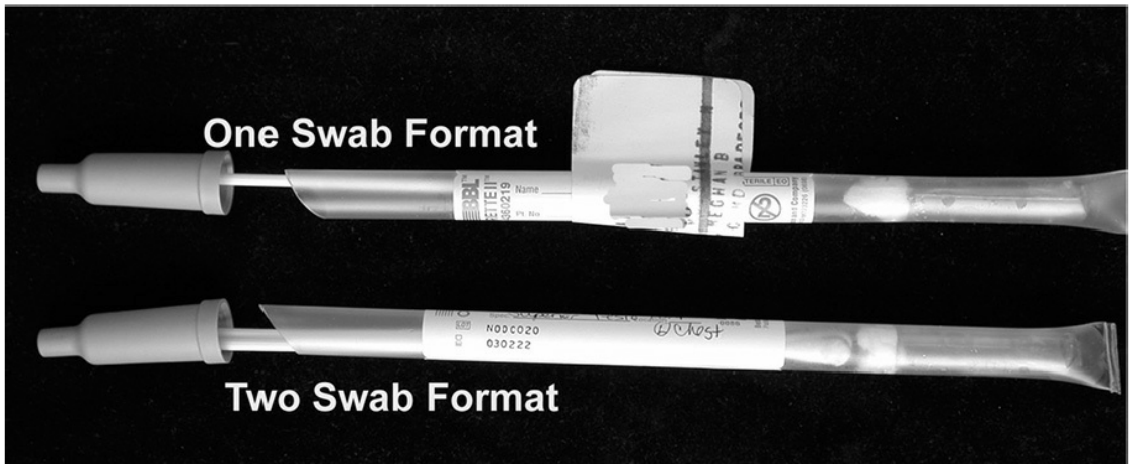
نکاتی که در استفاده از سواب‌ها باید در نظر گرفته شود:

سواب‌هایی از جنس کتان ممکن است حاوی اسیدهای چرب، کلسیم و آلژینات بوده و رشد باکتری‌های پرنیاز را مهار کنند. سواب‌هایی از جنس داکرون یا پلی استر ریون غالباً مناسب تر هستند.

نمونه‌ها نباید مدت طولانی بر روی سواب باقی بمانند. علاوه بر سمیت مواد تشکیل دهنده سواب‌ها ، توانایی جذب و سپس آزادسازی نمونه‌ها در آنهامتفاوت می‌باشد.

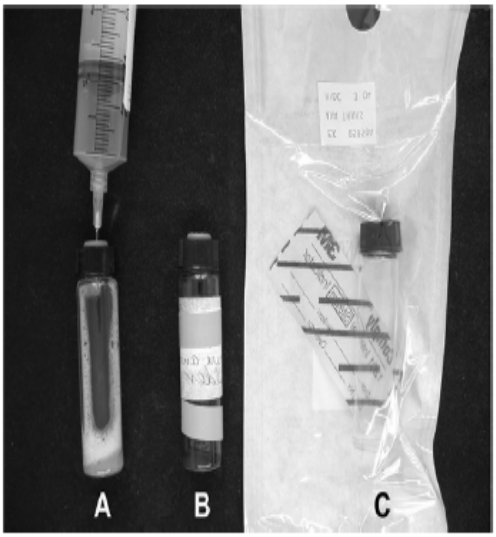
سواب‌ها جهت جلوگیری ازخشک شدن و مرگ باکتری‌ها باید در محیط انتقال یا ظروف مرطوب حمل شوند. البته در برخی نمونه‌ها مانند تراشه‌های پوست و یا ناخن جهت بررسی قارچ‌ها باید سواب‌ها در ظروف خشک انتقال داده شوند.

همچنین نمونه‌ها باید توسط دو سواب یا بیشتر جمع آوری شوند تا نمونه کافی برای آزمایشات مستقیم و کشت وجود داشته باشد(شکل ۵-۱).



شکل ۵-۱ :استفاده از دو سواب برای ارسال یک نمونه

برای جمع آوری نمونه‌های بی‌هوازی، سواب ابزار مناسبی نمی‌باشد و بهتر است نمونه توسط یک سرنگ استریل آسپیره شود، همچنین نمونه باید از خشک شدن و تماس با اکسیژن محافظت شود. البته امروزه محیط‌های انتقالی تولید شده است که می‌تواند هم باکتری‌های هوازی و هم بی‌هوازی را محافظت نماید(شکل۶-۱).



شکل۶-۱:انتقال نمونه هوازی/بی‌هوازی در ظروف و بسته بندی مخصوص

۵- در صورت امکان نمونه‌ها قبل از تجویز آنتی بیوتیک جمع آوری شوند.

۶- علاوه بر کشت باید از نمونه‌ها گسترش تهیه شده و مستقیماً بررسی شود.

یکی از مواردی که تهیه گسترش در تشخیص آن بسیار کمک کننده است ، بررسی نمونه خلط می‌باشد. مشاهده میکروسکوپی خلط به ما این امکان را می‌دهد که بتوانیم ماهیت التهابی نمونه و وجود باکتری را بررسی نموده و نتایج کشت را با این داده‌ها ارزیابی کنیم. برای مثال اگر در گسترش خلط فراوانی سلول‌های اپی تلیال را مشاهده کنیم نباید نمونه کشت داده شود.

۷- ظروف حاوی نمونه باید دارای برچسب با ذکر مشخصات باشند.

حداقل مشخصات شامل نام کامل بیمار، شماره معرف بیمار، منبع نمونه، نام پزشک و شماره تماس، تاریخ و ساعت جمع آوری نمونه می‌باشد.

ذکر منبع نمونه و مصرف آنتی بیوتیک به انتخاب بهتر محیط کشت کمک نموده و همچنین نام و شماره تماس پزشک ،جهت مشاوره و اطلاع رسانی یافته‌های اولیه مهم می‌باشد.

انتقال نمونه:

نکته اولیه در انتقال نمونه‌ها، فاصله محل نمونه برداری از آزمایشگاه می‌باشد. راهنمای کنترل کیفیت دستورالعمل‌های نمونه برداری وانتقال آن‌ها توسط

CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) ارائه شده است.

خطرات حمل دستی نمونه‌ها، با استفاده از ظروف مخصوص به حداقل می رسد. نمونه‌ها در حین انتقال باید در برابر شرایط محیطی نامناسب مانند سرما یا گرما، تغییرات شدید فشار و یا خشک شدن محافظت شوند.

بااستفاده از فریزر $-70^{\circ}C$ می‌توان زمان نگهداری و انتقال نمونه را افزایش داد(این زمان بستگی به نوع میکروارگانیسم دارد که در کتابچه‌های راهنما (Guide lines) مشخص شده است.

معمولاً نمونه‌های مایع باید هرچه سریع تر به آزمایشگاه منتقل شوند(شکل۷-۱). در بیمارستان‌ها معمولاً حداکثر زمان بین جمع آوری نمونه و ارسال آن ۲ ساعت می‌باشد. که این محدودیت زمانی مشکلی برای انتقال نمونه‌ها از مطب پزشکان به آزمایشگاه می‌باشد. البته جهت رفع این مشکل بنا به نوع نمونه دستورکارهای خاصی ارائه شده

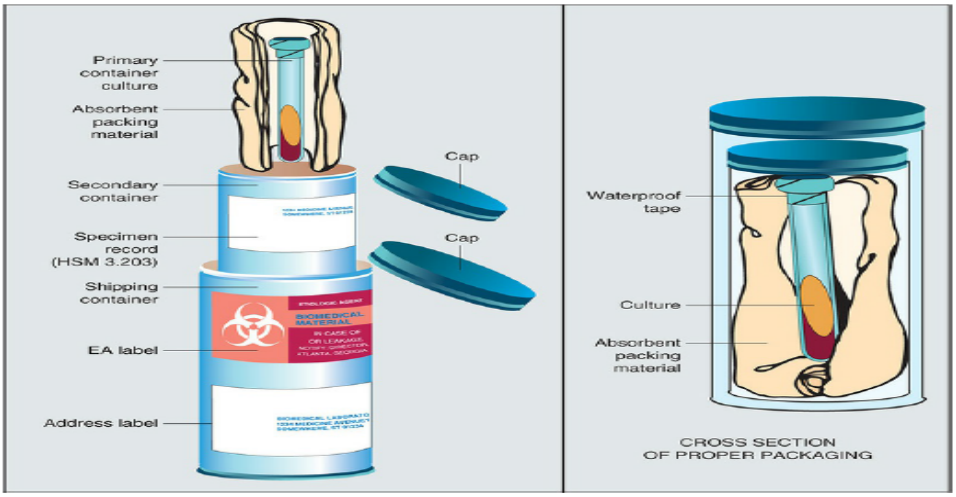
است. مثلاً برای نمونه کشت ادرار می‌توان از مقادیر کمی بوریک اسید استفاده کرد یا تا ۲۴ ساعت نمونه را در یخچال نگهداری کرد.

همچنین بر طبق دستورعمل‌ها می‌توان از محیط‌های انتقال استفاده کرد.

نمونه‌های خلط جهت بررسی مایکوباکتریوم‌ها و قارچ‌ها می‌توانند در ظروف پروپیلن و پلی اتیلن حمل شوند، از ظروف شیشه ای به علت احتمال شکستگی نباید استفاده شود(شکل ۸-۱).

Refrigerate	Room Temperature
Catheter tips (IV)	Abscess, lesion, wound
CSF for viruses	Body fluids
Ear: outer	CSF for bacteria
Feces (unpreserved)	Ear: inner
Feces for *Clostridium difficile* toxin (up to 3 d; >3 d store at −70° C)	Feces (preserved)
Sputum	Genital
Urine (unpreserved)	Nasal, N/P, throat
	Tissue
	Urine (preserved)

شکل۷-۱: راهنمای نگهداری نمونه‌ها



شکل ۸-۱ :نمایش بسته بندی نمونه پرخطر در ظروف جمع آوری و انتقال

دریافت نمونه و مشاهده مقدماتی

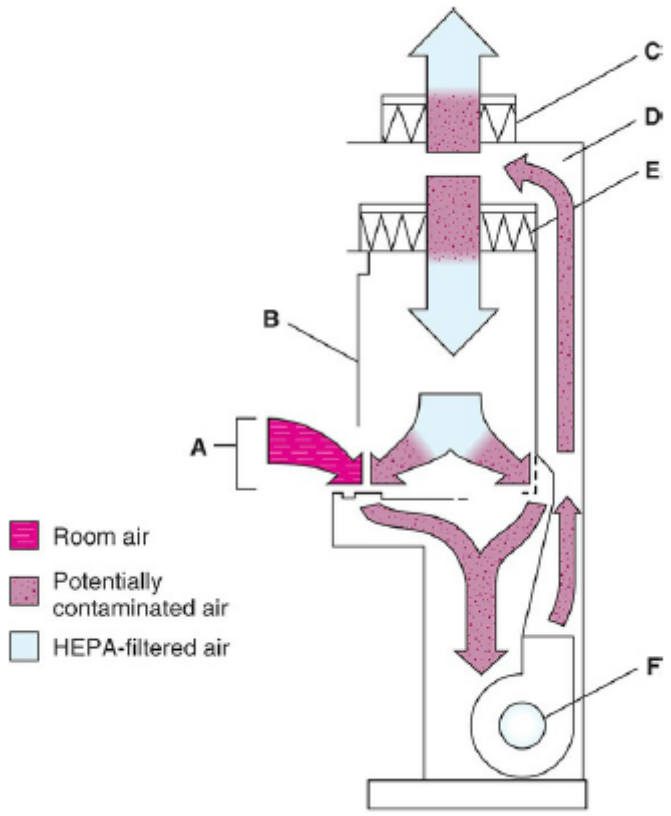
مشاهدات مقدماتی و حمل نمونه‌ها به دلیل پیشگیری از آلودگی کارکنان با عوامل بیماری‌زا، باید در یک اتاقک ایمن (Biology safety cabinet) انجام گیرد(شکل۹-۱). کارکنان باید با پوشیدن لباس آزمایشگاه دستکش، ماسک و... خود را در عوامل بیماری‌زای احتمالی محافظت نمایند. امروزه به علت احتمال آلودگی خون و سایر مایعات بدن با ویروس‌های HCV و HIV تمامی نمونه‌ها، نمونه پر خطر در نظر گرفته می‌شود.

این مرحله شامل :

۱- ثبت داده‌های مربوط به نمونه‌ها (کامپیوتر یا کتابچه و...).

۲- بررسی و مشاهده شاخص‌های نمونه به عنوان یک نمونه قابل قبول (شرایط بازگشت نمونه را نداشته باشند).

۳- مشاهده میکروسکوپی برای نمونه‌های خاص و گزارش تشخیص احتمالی.



شکل۹-۱ :نمایش اتاقک ایمن(Safety cabinet)

شاخص‌های بازگرداندن نمونه‌های بالینی (Specimen Rejection)

۱- کامل نبودن اطلاعات برچسب نمونه و برگه درخواست آزمایشات. یک فرد مسئول عموماً در چنین موردی اطلاعات را از محل ارسال نمونه تکمیل می‌نماید، چون ممکن است احتمال نمونه گیری مجدد نباشد. در این حالت در برگه گزارش نتیجه، می‌توان ذکر نمود که داده‌های نمونه ناقص بوده است و توسط فرد (نام و نام خانوادگی) تکمیل شده است.

۲- نمونه ای که در دمای نامناسب انتقال داده شده است.

۳- نمونه ای که در محیط نامناسب منتقل شده است.

۴- نمونه‌ای که در فرمالین ارسال شده است. (اگر قطعات بزرگ بوده و تماس با فرمالین کمتر از یک ساعت باشد می‌توان با برداشت از مرکز نمونه آن را کشت داد).

۵- گسترش ترشحات Anus, Vaginal canal , Uterine cervix برای تشخیص نایسر یا گونوره آ (Neisseria gonorrhoeae) به روش رنگ آمیزی گرم (Gram staining).

۶- نمونه بی هوازی که در شرایط هوازی منتقل شده است.

۷- درخواست کشت بی‌هوازی برای نمونه شستشو معده، ادرار، حلق، بینی و یا سایر نمونه‌های Oropharyngeal(به جز نمونه‌های بافت عمقی در جراحی دهانی) ،مدفوع (بجز بررسی کلستریدیوم دیفسیل) ، کشت‌های محیطی ، سوابهای Ileostomy یا Colostomy و Super facial .

۸- نمونه ای که حجم کافی برای آزمایشات ندارد.

۹- نمونه خلط ۲۴ ساعته

۱۰- یک سواب برای چند آزمایش ،مثلاً برای تشخیص قارچ، باکتری و ...

۱۱- نمونه‌ای که درظرف غیر استریل، آلوده و نامناسب ارسال شده است و مایع از آن ظرف نشت کرده است.

۱۲- نمونه ای که مدت زمان انتقال آن به آزمایشگاه خیلی طولانی بوده است.

۱۳- پلیت‌های کشت که رشد خیلی زیادی دارند و یا خشک شده اند.

۱۴- نمونه‌ای که آلودگی در آن‌آشکار است مانند حضور رنگ‌ها، مواد شیمیایی روغنی و یا باریوم

آنالیز نمونه‌ها (Analytic phase)

این مرحله شامل آزمایش میکروسکوپی،کشت نمونه‌ها، تشخیص و آنتی بیوگرام می‌باشد.

الف) آزمایش میکروسکوپی: انجام این مرحله به دلایل زیر بسیار مهم می‌باشد.

۱- تعداد و درصد نوتروفیل‌ها(Segmented neutrophils) شاخص نوع پاسخ التهابی است و می‌تواند کیفیت نمونه را ارزیابی کند(مانند نمونه خلط).

۲- مشاهده باکتری‌ها، قارچ‌ها (اشکال رشته ای و مخمری)، ساختمآن‌های انگلی و Viral inclusions (ساختارهای درون سلولی که توسط ویروس در سلول ایجاد می‌شود) می‌توانند به تشخیص احتمالی عامل عفونت کمک کنند.

۳- تشخیص احتمالی در نمونه‌های بی‌هوازی

۴- تشخیص احتمال آلودگی کشت ، وقتی هیچ ارگانیسمی در آزمایش میکروسکوپی مشاهده نشده ولی بیش از سه نوع میکروارگانیسم در محیط کشت رشد کرده باشد.

استریلیزاسیون و ضدعفونی کردن:(Sterilization and Disinfection)

استریلیزاسیون: روندی است که منجر به کشته شدن تمامی اشکال میکربی(حتی اسپرها) می‌شود.

ضدعفونی کردن: روندی است که ارگانیسم‌های بیماری‌زا را تخریب می‌کند، اما الزاماً تمامی میکروارگانیسم‌ها و یا اسپرها را از بین نمی برد. استریلیزاسیون و ضدعفونی کردن به دو روش مکانیکی و شیمیایی انجام می‌شود.

روش‌های استریلیزاسیون:

الف: روش‌های فیزیکی

۱- سوزاندن

۲- حرارت مرطوب

۳- حرارت خشک

۴- استفاده ازصافی‌ها

۵- اشعه‌های یونیزان

۱- **سوزاندن**

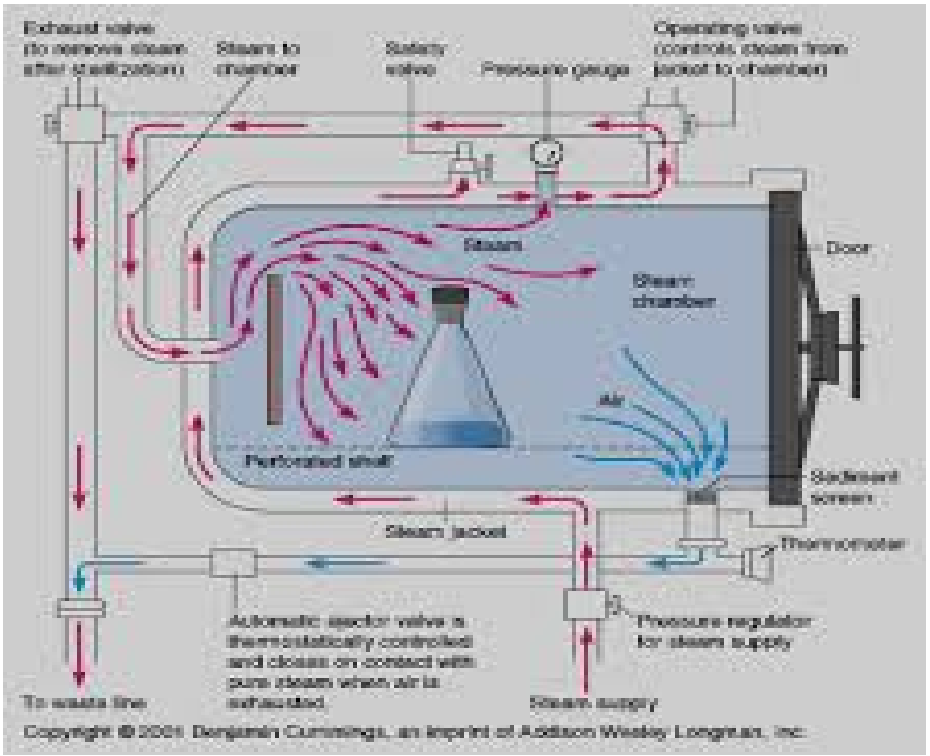
معمول ترین و مطمئن ترین روش برای از بین بردن زباله‌های عفونی می‌باشد. مواد خطرناک در دمای ۹۸۰°c - ۸۷۰°c سوزانده شده و تبدیل به خاکستر می‌شوند.پریونها (پروتئین‌های عفونی) توسط روش‌های معمول دیگر از بین نمی‌روندو به همین علت سوزاندن بهترین روش برای این نمونه‌ها می‌باشد. تشکیل گازهای سمی و فلزات سنگین در خاکستر، استفاده از این روش را محدود می‌کند.

۲- **حرارت مرطوب** (استفاده از بخار تحت فشار) استفاده از حرارت مرطوب سریع ترین و ساده ترین روش استریلیزاسیون است. در این روش از وسیله ای به نام اتوکلاو جهت استریل نمودن مواد مقاوم به حرارت و زباله‌های عفونی استفاده می‌شود.

منبع گرمایشی اتوکلاو ،آب داخل محفظه اولیه را تبدیل به بخار نموده، بخار حاصل وارد محفظه ای که مواد و وسایل مورد نظر قرار گرفته شده و چون سبک تر از هوا می‌باشد در بالای محفظه قرار گرفته و به تدریج هوا را از محفظه خارج می‌کند. به تدریج فشار و دمای داخل محفظه بالا می‌رود و توسط کنترل کننده فشار و دما در نقطه ای که از قبل انتخاب شده است ، ثابت می‌شود. معمولاً فشار PSI ۱۵ یا ۱.۵ اتمسفر، دمای °c ۱۲۱ یا °c ۱۳۲ وزمان ۶۰-۳۰ دقیقه انتخاب می‌شود. در این فشار پروتئین‌های ساختمانی و آنزیمی به صورت غیر برگشت پذیر تخریب می‌شوند. دمای °c ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه جهت استریل نمودن محیط‌های کشت، مایعات و ابزار استفاده می‌شود و دمای °c ۱۳۲ به مدت ۶۰ – ۳۰ دقیقه برای استریل نمودن زباله‌های عفونی به کار می‌رود(شکل ۱۰-۱،۱۱-۱ و۱۲-۱).

شکل ۱۰-۱:تصویر دستگاه اتوکلاو

شکل ۱۱-۱:تصویر دستگاه اتوکلاو



شکل ۱۲-۱: اجزادستگاه اتوکلاو

۳-حرارت خشک

استفاده از این روش نیاز به دما و زمان بیشتری نسبت به حرارت مرطوب دارد. از دستگاهی به نام آون (Oven)، فور یا اجاق پاستور استفاده می‌شود. به این روش می‌توان شیشه‌ها، روغن‌ها و پودرها را استریل نمود. دمای مورد استفاده معمولاً ۱۸۰°c به مدت ۱.۵ ساعت ویا ۱۶۰°c به مدت ۳ ساعت می‌باشد(شکل۱۳-۱).

شکل۱۳-۱:تصویر دستگاه فور

۴-استفاده از صافی‌ها

فیلتراسیون روش انتخابی برای استریل کردن محلول‌های حساس به حرارت مانند محلول‌های آنتی‌بیوتیکی، مواد شیمیایی سمی، رادیوایزوتوپ‌ها، واکسن‌ها و قندها می‌باشند. معمولاً برای محلول‌ها از صافی‌های استات سلولز و نیترات سلولز استفاده می‌شود(شکل۱۴-۱).

فیلترها جهت پاکسازی هوا از ذرات بزرگتر از ۰/۳ µm (میکرومتر) به کار می‌روند، مانند استفاده از فیلترهای HEPA (High Frequency Particulate Air)در اتاق‌های عمل،اتاق‌های ایزوله واتاقک‌های ایمن (Safety Cabinet).

شکل۱۴-۱:استفاده از سرنگ جهت استریل کردن

۵-پرتوهای یونیزان:

از این پرتوها (اشعه گاما با طول موج کوتاه و انرژی بالا) در میکروویوها و دستگاه‌های رادیوگراف استفاده شده است. پرتوهای یونیزان برای استریل کردن وسایل یک بار مصرف مانند سرنگ‌های پلاستیکی، کاتترها و یا دستکش‌هااستفاده می‌شود.

ب: مواد شیمیایی استریل کننده

معمول ترین ماده شیمیایی استریل کننده گاز اکسید اتیلن است که در استریل کردن مواد حساس به حرارت استفاده می‌شود.

بخار پراکسید هیدروژن (به عنوان یک عامل اکسید کننده) برای استریل کردن فیلترهای HEPA اتاقک‌های ایمن و ابزار فلزی و غیر فلزی استفاده می‌شود.

هیدروژن پراکسید گاز پلاسما روش دیگری است که با استفاده از هیدروژن پراکسید در یک فضای بسته تحت خلا شدید(با استفاده از رادیو فرکانس یا انرژی میکروویو)،پلاسما ایجاد می کند.

گلوتارآلدئید، ماده شیمیایی دیگری است که در مدت ۱۰-۳ ساعت می‌تواند اسپرهای باکتری‌ها را از بین ببرد و در استریل کردن برونکوسکوپ‌ها (Bronchoscope) به علت عدم خوردگی لنزها، فلزها و یا لاستیک‌ها قابل استفاده می‌باشد.

پراستیک اسید ۰.۲۳ درصد نیز در استریل کردن سطوح وسایل جراحی استفاده می‌شود.

استفاده از گلوتارآلدئید، پراستیک اسید و یاOPA (Orthophthaldehyde) استریلیزاسیون سرد نامیده می‌شود.

استریل کردن جهت پریون ها:

پریونها (پروتئین‌های عفونی) توسط روش‌های معمول از بین نمی‌روند و باید تمهیدات بیشتری در نظر گرفت،توجه به این موضوع جهت استریل کردن ابزار جراحی که در تماس با بافت های پرخطر بدن مانند چشم،مغز و نخاع بوده اند، اهمیت زیادی دارد. چهار روش پیشنهاد شده است:

۱.استفاده از اتوکلاو(prevacum sterilizer) در دمای ۱۳۴ درجه سانتیگرادبه مدت ۱۸ دقیقه.

۲. استفاده از اتوکلاو(Gravity displacement sterilizer) در دمای 132 درجه سانتیگرادبه مدت 60 دقیقه.

۳.غوطه ور کردن در هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به مدت ۱ ساعت، تخلیه و آبکشی با آب و در نهایت استفاده ازاتوکلاو (Gravity displacement sterilizer) در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد یا اتوکلاو (Gravity displacement sterilizer) در دمای ۱۳۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه.

۴.غوطه ور کردن در هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به مدت ۱ ساعت، تخلیه و آبکشی با آب ، استفاده ازاتوکلاو (Gravity displacement sterilizer) در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد یا اتوکلاو (Gravity displacement sterilizer) در دمای ۱۳۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و در نهایت استریلیزاسیون معمول.

روش‌های ضدعفونی کردن:

الف: روش‌های فیزیکی ب: روش‌های شیمیایی

الف: روش‌های فیزیکی ضدعفونی کردن شامل: جوشاندن، پاستوریزاسیون واستفاده از پرتوهای غیریونیزان می‌باشد.

۱-**جوشاندن:** این روش با استفاده از دمای ۱۰۰°c به مدت ۱۵ دقیقه باعث مرگ اشکال رویشی باکتری‌ها می‌شود.

۲- **پاستوریزاسیون:**

در این روش از دمای ۷۰°c به مدت ۳۰ دقیقه استفاده می‌شود که علاوه بر کشتن باکتری‌های بیماری‌زای موجود در مواد غذایی ،آسیبی در ارزش و طعم مواد غذایی ایجاد نمی‌کند.

۳-**پرتوهای غیر یونیزان**: مانند اشعه ماوراء بنفش (UV)این پرتو طول موج بلند و انرژی کم دارد، به همین دلیل قدرت نفوذ به منافذ را ندارد و فقط قادر به از بین بردن باکتری‌هایی است که در سطح هستند.

ب: روش‌های شیمیایی ضدعفونی کردن

ضدعفونی کننده‌های شیمیایی انواع متفاوتی دارندو شامل الکل‌ها، آلدئیدها،هالوژن‌ها، پراستیک اسید،هیدروژن پراکسید، ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و فنل‌ها می‌باشند.

مواد ضدعفونی کننده ای که برای پوست استفاده می‌شوند مواد آنتی سپتیک (Antiseptic) نامیده می‌شوند.

فاکتورهایی که در عملکرد ضدعفونی کننده‌های شیمیایی مؤثر هستند، توسط شرکت های تولید کننده مشخص شده و مصرف کنندگان ملزم به رعایت آن ها هستند.

عبارتند از:

۱- نوع میکروارگانیسم‌ها

۲- دما و pH

۳- تعداد میکروارگانیسم‌ها

۴- غلظت ماده ضدعفونی کننده

۵- مقدار مواد طبیعی حاضر در محیط (خون موکوس، چرک)،که ممکن است ماده ضدعفونی کننده را غیر فعال کنند یا باعث عدم تماس ماده ضدعفونی کننده با مواد آلوده شوند.

۶- ماهیت سطحی که باید ضدعفونی شود (متخلخل یا صیقلی)

۷- مدت زمان تماس مواد شیمیایی

۸- نوع آبی که استفاده می‌شود (سختی بالا یا سختی کم) آب سخت ممکن است باعث کاهش اثر ضدعفونی کننده شود).

میکروارگانیسم ها به ترتیب مقاومت به مواد ضدعفونی کننده عبارتند از پریون ها، اسپرها و بعد از آن‌ها به ترتیب مایکوباکتریوم‌ها (باسیل‌های مقاوم به اسید)، ویروس‌های بدون پوشش ، قارچ‌ها، شکل رویشی باکتری‌ها و ویروس‌های پوشش دار (حساس ترین به مواد ضدعفونی کننده) قرار می‌گیرند.

بنابراین بر اساس این که چه میکروارگانیسمی را در چه محلی باید از بین ببریم، ماده ضدعفونی کننده متفاوتی استفاده می‌شود. ابزاری که به مواد طبیعی مانند خون، چرک یا موکوس آغشته هستند ابتدا باید به صورت مکانیکی (شستشو) این مواد حذف شوند و سپس در تماس با ماده ضدعفونی کننده قرار گیرند.

الکل‌ها

اتیل الکل یا ایزوپروپیل الکل ۹۰-۶۰ درصد قدرت کشتن باکتری، ویروس، قارچ و مایکوباکتریوم را دارند.در استفاده از الکل‌ها باید توجه شود که اتانول ۷۰٪ قدرت کشندگی بالاتری ازاتانول ۹۰٪ دارد که به علت وجود آب بیشتر سبب هیدرولیز پیوندها در پروتئین‌ها و در نتیجه مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌شود.

اتیل الکل یا ایزوپروپیل الکل قدرت کشندگی اسپرهای باکتری‌ها را ندارند. بنابراین استفاده ازآن محدود به ضدعفونی پوست به عنوان یک آنتی سپتیک، ضدعفونی دماسنج و سطح ویال‌های تزریقی پلاستیکی می‌شود.

هیدروژن پروکساید

این ماده قدرت کشندگی باکتری ها، اسپرها، ویروس هاو قارچ ها را دارد. هیدروژن پروکساید۳٪ به عنوان ضدعفونی کننده سطوح استفاده می شود.

فرمالدئید و گلوتارآلدئید به علت بخارات آسیب زا به عنوان ضدعفونی کننده سطوح استفاده نمی‌شوند. گلوتارآلدئیداسپروسیدال است و در عرض ۱۰-۳ ساعت اسپرها را از بین می برد به همین جهت برای ضدعفونی برونکوسکوپ ها(بدون آسیب به لنزها،فلزات و قطعات لاستیکی) استفاده می شود.

هالوژن‌ها: خصوصاً ید و کلر عمدتاً به عنوان ضدعفونی کننده استفاده می‌شوند.

کلر: در آمریکا معمول ترین ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم (Naocl) ۶.۱۵-۵.۲۵ درصد می باشد(صفید کننده خانگی).این ماده قدرت کشتن باکتری، ویروس، قارچ، مایکوباکتریوم و اسپرهارا دارد. مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC)محلول ۱:۱۰ هیپوکلریت سدیم را برای تمیز کردن سطوحی که به خون آغشته شده اند(میز-تخت) ، توصیه می‌کند.

ید:معمولاً به صورت ترکیبی با الکل یا به صورت یدوفور همراه یک پلیمر خنثی مانند پویدون آیودین (Povidone-Iodine) به کار می‌رود. هر دو ترکیب به عنوان آنتی سپتیک استفاده می‌شوند. در واقع استفاده از اتانول ۷۰٪ متعاقب آن استفاده از یک یدوفور معمول ترین روش ضدعفونی پوست قبل از خونگیری می‌باشد.

به علت سمیت جیوه برای طبیعت، فلزات سنگین حاوی جیوه دیگر توصیه نمی‌شوند، اما یک قطره چشمی حاوی ۱٪ نیترات نقره هنوز برای محافظت چشم نوزادان از عفونت نایسر یا گونوره آ توصیه می‌شود.

ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی:

این مواد برای سطوح آزمایشگاه استفاده می‌شوند. آلودگی سطوح با خون و سایر مواد آلی ،استفاده از ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی و فلزات سنگین را محدود می‌کند.

فنل‌ها (کربولیک اسید):

این ترکیبات با غلظت‌های ۵ - ۲٪ در ضدعفونی و تمیز کردن سطوح میزها به کار می‌روند.

نکته مهم این است که در استفاده از ضدعفونی کننده‌ها و بیوسیدها، حتماً طبق دستور کارخانه سازنده عمل شود.

جلسه دوم: روش‌های مطالعه میکربشناسی نمونه‌های بالینی

دستور کار:

تهیهٔ گسترش از شیارلثه یا سواب حلق (رنگ آمیزی به روش ساده)

رنگ آمیزی گسترش آماده به روش گرم

رنگ آمیزی گسترش آماده به روش زیل نلسون

رنگ آمیزی گسترش آماده به روش ورمالاشیت

مشاهده میکروسکوپی انواع باکتری ها به روش گرم

مشاهده میکروسکوپی اسپریل (رنگ آمیزی فونتانا)

مشاهده میکروسکوپی باسیل مقاوم به اسید(مایکوباکتریوم توبر کلوزیس و لپره) به روش زیل نلسون

مشاهده میکروسکوپی باسیل چماقی شکل(کورینه باکتریوم دیفتریه،رنگ آمیزی آلبرت) تهیه شده از محیط کشت

مشاهده هلیکوباکتر پیلوری

بررسی نمونه های بالینی جهت شناسایی عوامل عفونی به روش های مختلف انجام می شود.

الف- میکربیولوژی ملکولی

تکنیک‌های ملکولی یکی از قویترین ابزارها در بررسی میکروارگانیسم‌ها می‌باشند که سرعت بالایی در تعیین نوع و مشخصات آن‌ها دارند. این روش‌ها تحول بزرگی در آزمایشگاه میکرب شناسی ایجاد کرده اند و باعث تغییر در روش تشخیص میکروارگانیسم‌ها، مشخصات و میزان آن‌ها شده است. در برخی از این روش‌ها این توانایی سبب شده است که مستقیماً از نمونه بالینی طی چند ساعت نتایج لازم را بدست آوریم.

میکربیولوژی ملکولی بر اساس استفاده از اسیدنوکلئیک به ۳ بخش تقسیم می‌شود.

۱- شناسایی میکروارگانیسم بدون استفاده از تکثیر اسید نوکلئیک می‌باشد. در این روش از نور یا رنگ حاصل از هیبریداسیون یک پروب اسید نوکلئیک و اسید نوکلئیک استفاده می‌شود.

۲- با استفاده از تکثیر اسید نوکلئیک نوع میکروارگانیسم، مشخصات آن و میزان آن تعیین می‌شود.

۳- روش‌های ملکولی که جهت تعیین ارتباط بین میکروارگانیسم (تایپینگ گونه‌ها) استفاده می‌شوند، یکی از ابزارهای مهم برای اپیدمیولوژی سلامت می‌باشند.

پس از انجام این مراحل نتایج به دست آمده آنالیز می‌شوند که بر اساس روش استفاده شده ،آنالیز متفاوت می‌باشد :

۱- ژل الکتروفورز (Gel electrophoresis)، ساترن بلات(Southern Blot)

۲- DNA Sequencing

۳- Magnetic Resonance

ب -روش Mass Spectrometry

در این روش شناسایی و تعیین مشخصات میکروارگانیسم‌ها بر اساس پروتئین‌های آن‌ها می‌باشد و در میکرب شناسی به روش MALDI-TOF که نوعی Mass Spectrometry است انجام می‌شود.

امروزه دو دستگاه اسپکترومتر تأیید شده به صورت تجاری(MALDI Biotype وVITEKMS) موجود می‌باشد.

زمان تشخیص میکروارگانیسم با دستگاه های فوق حدود ۳ دقیقه است در حالی که با روش کشت ۱.۵-۱ روز زمان می برد.

در این روش نمونه باکتری یا مخمر به وسیله لیزر فعال می‌شود. جذب لیزر سبب تولید حرارت و در نتیجه جداسازی بخش‌های خارجی نمونه می‌شود. میزان یون‌های جدا شده در فضایی از خلاء به سمت Detector حرکت می‌کنند که بر اساس نسبت میزان ماده به بارالکتریکی آن و زمان رسیدن آنها به Detector ، شناسایی می‌شوند.

البته این روش هم محدودیت‌هایی دارد.برای مثال هر گونه آلودگی میکربی باعث خطا در تشخیص می شود. در مجموع MALDI-TOF پیشرفت مهم و مقرون به صرفه ای در میکربشناسی بالینی می‌باشد که طیف گسترده ای از میکروارگانیسم‌ها را شناسایی می‌کند.

روش‌های ملکولی به سرعت در حال ارتقاء هستند تا با روش‌های دقیق تر و سریع تری ، عوامل عفونت و مشخصات آن‌ها را تعیین کنند.

ج-روش کشت

مشاهده مستقیم

روش‌های میکروسکوپی

جهت مشاهده میکروسکوپی نمونه‌های بالینی از تکنیک‌ها و میکروسکوپ های متفاوت استفاده می‌شود.

میکروسکوپ نوری بیشترین کاربرد را در آزمایشگاه بالینی دارد.

میکروارگانیسم‌ها وقتی مستقیماً با میکروسکوپ‌های نوری بررسی می‌شوند قابل مشاهده نیستند، به همین جهت قبل از بررسی رنگ آمیزی می‌شوند. البته در مواردی می‌توان نمونه‌های بدون رنگ را با تغییر در سیستم نور میکروسکوپ مشاهده کرد، مانند استفاده از میکروسکوپ زمینه سیاه (Dark field).

رنگ‌ها: در بررسی میکروارگانیسم‌ها از رنگ‌های متفاوتی استفاده می‌شود که بر اساس هدف معینی انتخاب می‌شوند. مانند تغییر رنگ‌ها در محیط‌های بیوشیمیایی، تغییرات pH، تغییر رنگ به علت اکسیداسیون یا احیاء مانند تغییر رنگ معرف سنجش حضور یا عدم حضور شرایط بی‌هوازی محیط، تغییر رنگ به علت عملکرد فیزیولوژیک میکروارگانیسم و هم چنین استفاده از رنگ‌ها جهت مشاهده میکروارگانیسم‌ها توسط میکروسکوپ.

استفاده از رنگ‌ها و مشاهده میکروسکوپی نمونه‌های بالینی در بررسی کیفی نمونه بالینی، انتخاب محیط کشت و همچنین تشخیص احتمالی سریع عامل عفونت مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از معمول ترین رنگ آمیزی‌ها، رنگ آمیزی گرم (Gram's Stain) می‌باشد که به روش زیر انجام می‌شود.

رنگ آمیزی گرم:

الف- تهیه گسترش

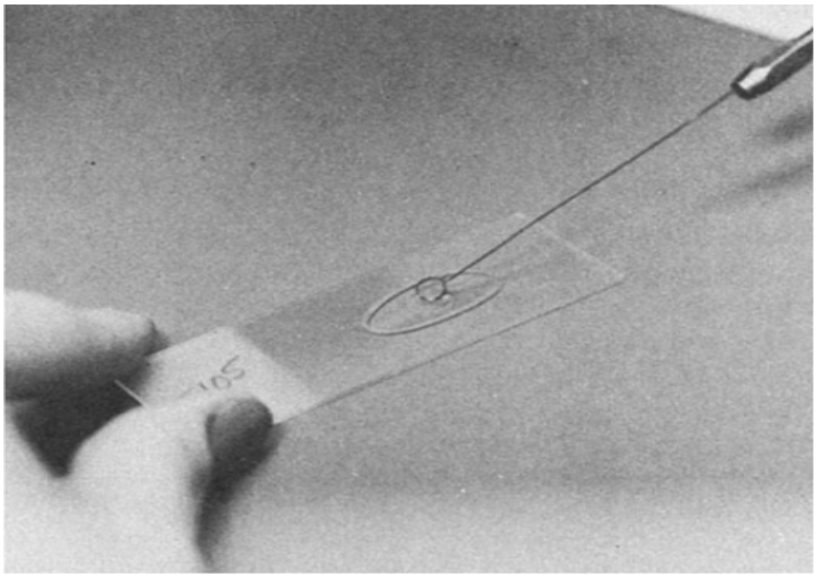
ب-خشک کردن

ج-ثابت کردن

د-رنگ آمیزی

الف-تهیه گسترش

لایه ی نازکی از نمونه بالینی یا باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت را برروی یک صفحه شیشه ای تمیز (لام) می گسترانیم. بهتر است نمونه از کناره‌های لام فاصله داشته باشد. (شکل۱-۲)



شکل۱-۲: روش تهیه گسترش تهیه گسترش

اگر نمونه رقیق باشد، ابتدا سانتریفیوژ شده و سپس از آن گسترش تهیه می‌کنیم و اگر نمونه غلیظ یا جامد باشد باید آن را رقیق نمود، به طوری که بتوان لایه نازکی از آن تهیه کرد.

تهیه نمونه از محیط کشت جامد و مایع

مراحل تهیه گسترش در شکل (۲-۲)مشخص می‌باشد.

تهیه گسترش از محیط کشت مایع

۱- تکان دادن لوله آزمایش محتوی مایع جهت بکنواخت شد

۲- استریل کردن لوپ

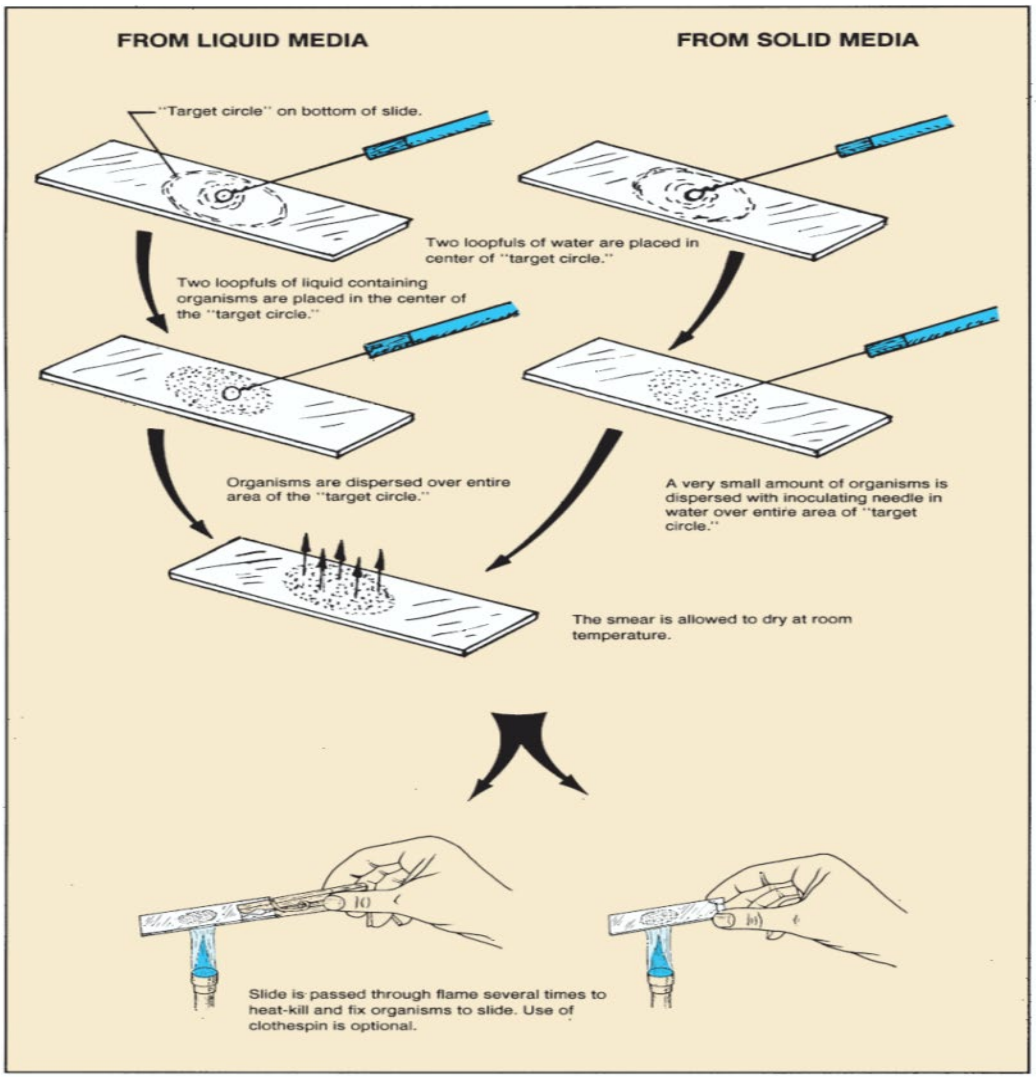
۳- برداشتن درپوش لوله و حرارت دادن دهانه لوله

۴- برداشتن یک لوپ از باکتری (در حین خارج کردن، لوپ با دیواره لوله تماس نداشته باشد)

۵- حرارت دادن دهانه لوله و گذاشتن درپوش لوله

۶- قرار دادن محتویات لوپ در مرکز لام و تهیه گسترش (با حرکت چرخشی لوپ سوسپانسیون یکنواخت ایجاد کنید و دقت کنید که گسترش خیلی ضخیم یا نازک نبوده و از کناره‌های لام نیز فاصله داشته باشد).

۷- استریل کردن مجدد لوپ



شکل ۲-۲: روش تهیه گسترش از[۳] محیط جامد و مایع

تهیه گسترش از محیط جامد

۱- لوپ استریل شود

۲- با لوپ یک قطره آب در وسط لام گذاشته شود

۳- لوپ مجددا استریل و سرد شود

۴- مقدار بسیار کمی از کلونی باکتری برداشت شده و بوسیله آب روی لام ،سوسپانسیون یکنواختی تهیه شود

۵-استریل کردن لوپ

ب-خشک کردن: لام‌ها باید در مجاورت هوا خشک شوند .در نمونه‌های پر خطر این کار در اتاقک ایمن (Safety cabinet) انجام می‌شود .

ج-ثابت کردن(فیکساسیون): با عبور دادن لام ازروی شعله (۴-۳ مرتبه) و یا با استفاده از صفحه گرم کننده ، نمونه بر روی لام ثابت می‌شود. برخی، از الکل‌ها(متانول ۹۵٪) برای ثابت کردن نمونه(نمونه های خون) استفاده می‌کنند.

د-مراحل رنگ آمیزی گرم

۱. پوشاندن سطح گسترش با رنگ کریستال ویوله (۱ دقیقه)

۲. خالی کردن رنگ و شستشو با آب (نیازی به خشک کردن بین مراحل نیست)

۳. پوشاندن سطح گسترش با محلول ید (لوگل) (۱ دقیقه)

۴. خالی کردن رنگ و شستشو با آب

۵. رنگ بری با رنگ بر (الکل-استن)یا (الکل)، معمولاً لام را با رنگ بر شستشو داده تا دیگر رنگ کریستال ویوله خارج نشود. در این آزمایشگاه از زمان ۴۰ ثانیه جهت رنگ بری استفاده می شود.

۶. شستشو با آب

۷. پوشاندن گسترش با سافرانین (۱ دقیقه)

۸. شستشو با آب

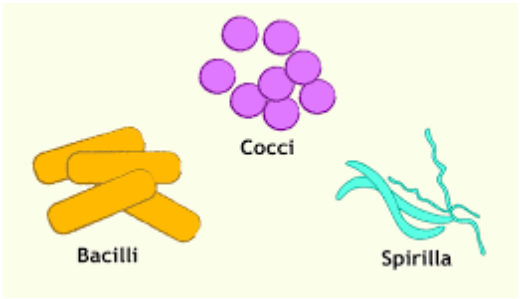
۹. خشک کردن لام، با جریان هوا میتوان لام‌ها را خشک نمود.

مشاهده با میکروسکوپ نوری

در مشاهده با عدسی با بزرگنمایی ۱۰۰ ،باکتری‌های گرم مثبت به رنگ آبی تیره (بنفش) و باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی مشاهده می‌شوند.در مواردی مانند باکتری‌هایی که واکنش گرم (Gram) متغیر دارند ،تشخیص این که باکتری گرم مثبت یا گرم منفی می‌باشد می‌تواند مشکل باشد که با انجام سایر آزمایشات قابل بررسی است.

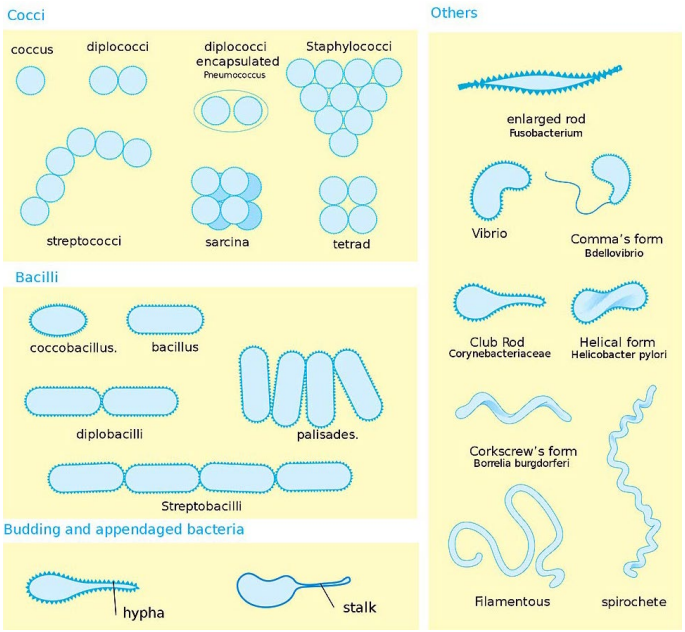
اشکال و آرایش باکتری‌ها

باکتری‌ها به اشکال متفاوتی مشاهده می‌شوند، بطور کلی به سه شکل کروی یا کوکسی (Cocci)،میله ای یا باسیل (Bacilli) و مارپیچی یا اسپیریل (Spirilli) دیده می‌شوند. (شکل۳-۲).



شکل۳-۲: شکل پایه باکتری‌ها

اشکال باسیلی ممکن است به شکل،دوکی یا فوزیفرم (Fusiform)،هلالی یا ویبریو(Curved)، چماقی یا کورینه شکل (Coryne form or Club form) وکوکوباسیل (Coccobacilli) مشاهده شوند(شکل۴-۲).



شکل۴-۲: شکل و آرایش باکتری‌ها

باکتری‌ها علاوه بر شکل مشخص ، دارای آرایش (چگونگی کنار هم قرار گرفتن باکتری‌ها)خاص نیز می‌باشند .ممکن است ، منفرد (مونو)، دوتایی (دیپلو)، رشته ای (استرپتو) و یا خوشه ای (استافیلو) مشاهده شوند(شکل۴-۲).

رنگ آمیزی ساده:

در این رنگ آمیزی از یک رنگ استفاده می‌شود.

۱- تهیه گسترش

۲- خشک کردن

۳- ثابت نمودن

۴- پوشاندن گسترش با متیلن بلو۴-۳ دقیقه

۵- شستشو با آب

۶- خشک کردن

۷- مشاهده با میکروسکوپ

تمامی باکتری‌ها و سلول‌ها به رنگ آبی مشاهده می‌شوند.

رنگ آمیزی اختصاصی:

برخی از رنگ‌ها و روش‌های رنگ آمیزی می‌توانند در مشاهده اجزاء باکتری‌ها مانند اسپر، کپسول، گرانول‌های ذخیره ای درون سلولی کمک نمایند.

هم چنین برخی از انواع رنگ آمیزی‌ها می‌توانند در شناسایی و افتراق باکتری‌ها استفاده شوند، مانند رنگ آمیزی مقاوم به اسید (Acid fast staining)، فونتانا ،آلبرت و....

رنگ آمیزی مقاوم به اسید (Acid fast staining)

از این رنگ آمیزی میتوان برای مشاهده مایکوباکتریوم‌ها استفاده کرد. این باکتری‌هابه علت دارا بودن ماده مومی شکل در سلوال خود مقاوم به رنگ بری توسط محلول اسید الکل هستند،با استفاده از این مشخصه می‌توان مایکو باکتریوم‌ها را با رنگ متفاوتی از سایر باکتری‌ها در گسترش مشاهده کرد.

رنگ آمیزی مقاوم به اسید به روش زیل نلسن (Ziehl and Neelsen)

۱- تهیه گسترش

۲- خشک کردن

۳- ثابت نمودن

۴- پوشاندن گسترش با رنگ کربول فوشین ۲۰ دقیقه

۵- شستشو با آب

۶- رنگ بری توسط محلول اسید الکل (به صورتی که گسترش رنگ خود را از دست می‌دهد)

۷- شستشو با آب

۸- پوشاندن گسترش با رنگ متیلن بلو (۴ دقیقه)

۹- شستشو با آب

۱۰- خشک کردن لام

۱۱- مشاهده با میکروسکوپ

باکتری‌های مقاوم به اسید به رنگ صورتی در زمینه ی آبی مشاهده می‌شوند ،در حالیکه سلول‌های بافت و سایر باکتری‌ها که مقاوم به اسید نیستند ،به رنگ آبی مشاهده می‌شوند. برخی از باکتری‌ها مانند نوکاردیا ،می‌توانند به صورت مقاوم به اسید ضعیف مشاهده شوند.

رنگ آمیزی فونتانا(Fontana staining)

با استفاده از این رنگ آمیزی باکتری را به رنگ قهوه ای تیره در یک زمینه قهوه ای روشن می‌توان مشاهده نمود. برخی از باکتری‌ها مانند اسپیروکتها و یا برخی باسیل‌های کوچک مانند بارتونلا با روش‌های معمول رنگ نمی‌شوند. رنگ آمیزی با نقره برای مشاهده این باکتری‌ها از جمله ترپونما پالیدوم عامل بیماری سفیلیس استفاده شده است.

رنگ آمیزی آلبرت (Albert staining)

از این رنگ آمیزی برای مشاهده دانه‌های متاکروماتیک در کورینه باکتریوم‌ها استفاده می‌شود.

۱- تهیه گسترش

۲- خشک کردن

۳- ثابت کردن

۴- پوشاندن گسترش با رنگ آلبرت (۹ دقیقه)

۵- خالی کردن رنگ بدون شستشو با آب

۶- پوشاندن گسترش با محلول لوگل (۶ دقیقه)

۷- شستشو با آب

۸- خشک کردن

۹- مشاهده با میکروسکوپ

به این روش باکتری‌ها با رنگ سبز و دانه‌های کرومتاتیک به رنگ آبی مایل به سیاه مشاهده می‌شوند.

رنگ آمیزی ورمالاشیت(Malachite green staining)

از این رنگ آمیزی برای مشاهده اسپرها در باکتری‌ها استفاده می‌شود.

۱- تهیه گسترش

۲- خشک کردن

۳- ثابت کردن

۴- پوشاندن رنگ با محلول مالاشیت گرین و استفاده از حرارت به مدت۵ دقیقه) (پس از اولین مشاهده بخار، شعله را کنار گذاشته وکمی بعد مجدداً لام را حرارت می دهیم . زمان لازم ۵ دقیقه از مشاهده اولین بخار از لام می‌باشد. توجه شود محلول رنگ نباید بجوشد)

۵- خالی کردن رنگ و کمی زمان تا لام سرد شود

۶- شستشو با آب

۷- پوشاندن گسترش با رنگ سافرانین (۳ دقیقه)

۸- شستشو با آب

۹- خشک کردن

۱۰- مشاهده با میکروسکوپ

در این روش اسپورها به رنگ سبز و باکتری‌ها به رنگ صورتی دیده می‌شوند.

جلسه سوم: کشت باکتری‌ها

دستور کار :

۱- کشت از دست ،پس از شستشو در محیط نوترینت آگار

۲- برداشت ازمحیط کشت جامد و کشت در محیط جامد شیب دار(Slant)

۳- برداشت از محیط کشت جامد و کشت در محیط مایع(Broth)

۴- برداشت از سوسپانسیون میکروبی و کشت برروی پلیت به روش ایزولاسیون

۵- مشاهده کلنی‌های کورینه باکتریوم در محیط کشت تلوریت پتاسیم

۶- مشاهده کلنی‌های ویبریو کلرا در محیط TCBS

۷- مشاهده کلنی مایکوباکتریوم در محیط کشت لونشتاین جانسون آگار(Lowenstein Jensen Agar)

۸- مشاهده محیط کشت دو فازی (Bactec)

در روند شناسایی باکتری‌ها در نمونه بالینی، پس از مشاهده مستقیم باید نمونه‌ها کشت داده شوند.

در این مرحله باید محیط های کشت مناسب انتخاب شوند و همچنین نیازمندی‌های دما، اتمسفر و زمان گرماگذاری (Incubation) در نظر گرفته شوند.

در مرحله بعدی باکتری‌هایی که بر روی محیط کشت اولیه رشد نموده اند، در محیط‌های کشت دیگری به جهت شناسایی و تعیین نوع باکتری و همچنین تعیین حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها کشت داده می‌شوند.

انتخاب محیط‌های کشت مناسب

جهت کشت اولیه نمونه‌ها، عموماً از محیط‌های کشت جامد (Solid –حاوی آگار) استفاده می‌شود ولی در مواردی مانند کشت خون، محیط کشت اولیه مایع (Broth) استفاده می‌شود.

انواع محیط‌های کشت :

۱- محیط کشت غنی شده(Enrichment media)

حاوی مواد غذایی خاص می باشد که به رشد باکتری ها با نیازمندی های خاص کمک می کند.مانند محیطBCYE (Buffered charcoal yeast Extract Agar)که رشد لژیونلا پنوموفیلا را فراهم می کند.

۲- محیط مغذی(Nutritive media)

محیط‌های مغذی غیر انتخابی فاقد باز دارنده‌ها می‌باشند و رشد بیشتر باکتری‌های نمونه بالینی را حمایت می‌کنند. محیط ژلوز خوندار (Blood Agar) محیطی غیر انتخابی است و با افزودن ۵ درصد خون گوسفند به محیط آگار تهیه می‌شود.

می‌توان با افزودن آنتی بیوتیک‌ها یا مواد شیمیایی ممانعت کننده، به محیط بلاد آگار آن را به یک محیط انتخابی تبدیل نمود.

۳- محیط انتخابی(Selective media):

محیط‌های کشت انتخابی شامل یک یا تعدادی مهارکننده هستند که رشد اکثر باکتری ها را مهار می کنند به جز باکتری که در حضور این مهار کننده قادر به رشد است.مانند محیط PEA (فنیل اتیل الکل آگار) حاوی ۵ درصد خون گوسفند، رشد باکتری های گرم منفی را مهار کرده و فقط رشد باکتری های گرم مثبت را حمایت می کند.

۴- محیط‌های کشت افتراقی: این دسته از محیط‌های کشت با افزودن یک رنگ معین، قندها یا سایر مواد شیمیایی تهیه می‌شوند، به طوری که باکتری‌هایی که در این محیط رشد می‌کنند با نشانه‌های خاصی از سایر باکتری‌ها مشخص می‌شوند. مانند محیط کشت مک کانکی آگار که باکتری‌هایی که توانایی تخمیرقند لاکتوز را دارند، کلنی‌های صورتی رنگ و آن‌هایی که این قند را تخمیر نمی‌کنند کلنی‌های بی رنگ تولید می‌کنند.

برخی از محیط های کشت بیش از یک عملکرد دارند، مانند مک کانکی آگار که یک محیط انتخابی و افتراقی است.

روش‌های کشت نمونه بالینی:

در این مرحله باید تمامی تمهیدات لازم جهت پیشگیری از انتقال عامل عفونت به کارکنان آزمایشگاه به عمل آید، مانند پوشیدن لباس مخصوص، دستکش، ماسک و سایر ابزار محافظت کننده در صورت لزوم.

با استفاده از یک وسیله برداشت مانند لوپ (Loop)، سواب (Swab) و... مقداری از نمونه بالینی به محیط‌های کشت مناسب منتقل می‌شود. انتقال نمونه و کشت باید درکنار شعله باشد تا فقط باکتری‌های موجود در نمونه رشد نمایند.

کشت به روش ایزولاسیون بر روی محیط کشت آگار

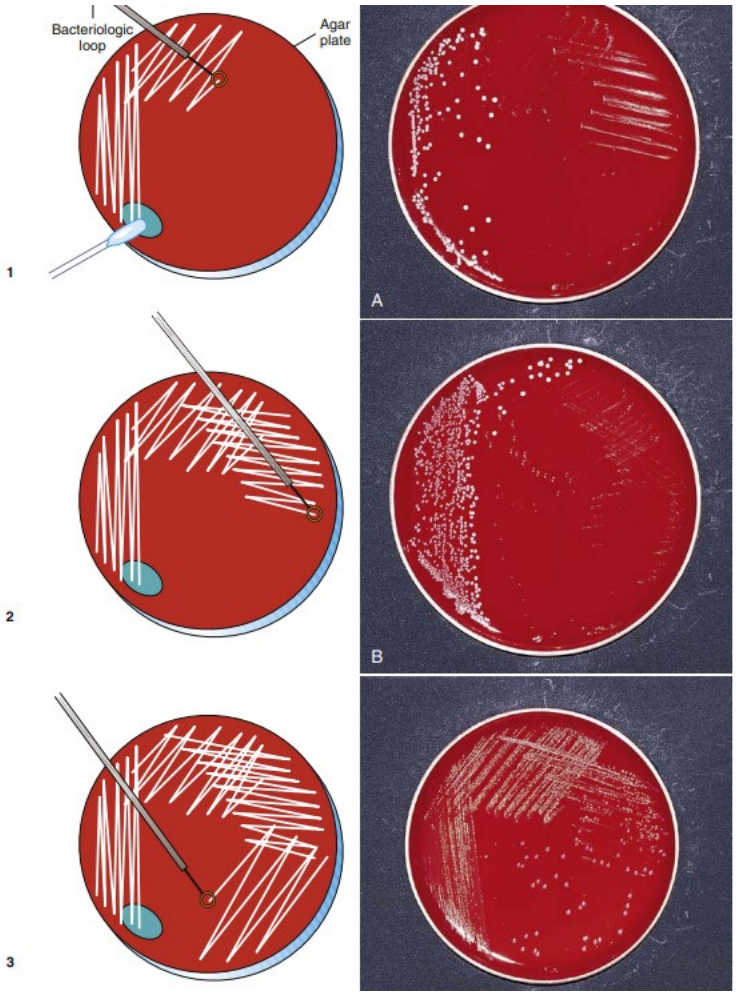
۱-ابتدا مقداری از نمونه بالینی را در قسمتی از پلیت بر روی محیط کشت استریل قرار داده و سطح محیط کشت را به صورت فرضی به چهار قسمت تقسیم می‌کنیم (شکل ۱-۳) .سپس نمونه بالینی را با لوپ استریل به صورت خطوط رفت و برگشتی در منطقه اول پخش می نمائیم. سرلوپ را توسط شعله استریل می‌نماییم.

۲-سپس با چرخاندن محیط کشت در جهت خلاف عقربه‌های ساعت و با زاویه ۹۰ درجه نسبت به مرحله قبل مجدداً از خطوط مرحله قبل، خطوط رفت و برگشتی گرفته و این عمل را سه مرتبه تکرار می‌کنیم.

۳-در منطقه چهارم خطوط رفت و برگشت را فقط از خط انتهایی گرفته و کشت می دهیم. در پایان کار حتماً لوپ استریل شود.

هدف از این نحوه کشت رقیق سازی نمونه بالینی و جداسازی باکتری‌های موجود در نمونه می‌باشد، به صورتی که روی سطح پلیت،کلنی‌هایی با فاصله تشکیل شوند تا بتوان در مراحل شناسایی از آن‌ها استفاده نمود.

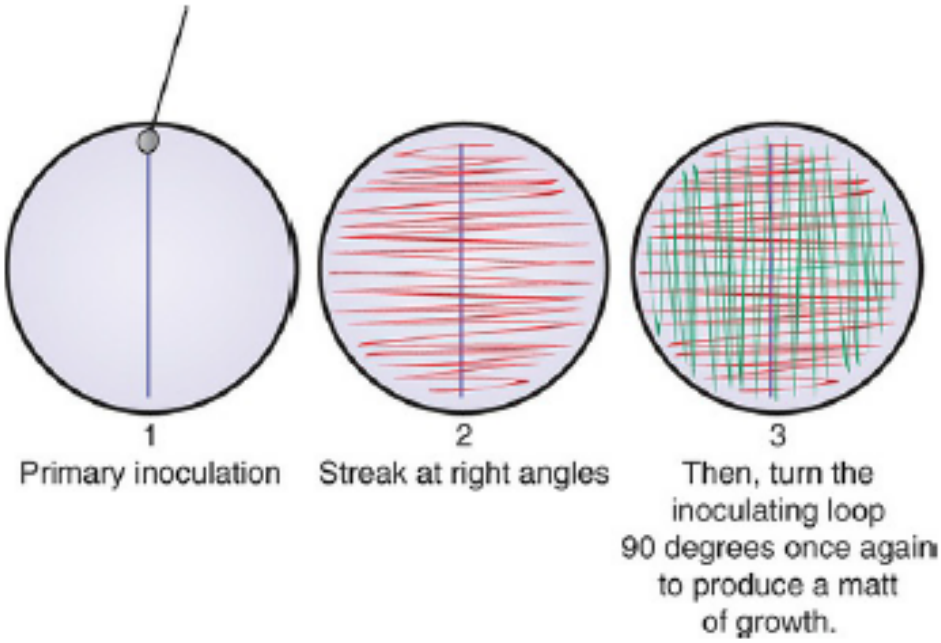
نمونه‌های بالینی که توسط سواب ارسال شده اند، مستقیماً توسط همان سواب به محیط کشت منتقل شده و خطوط منطقه ۲، ۳و۴ توسط لوپ استریل کشیده می‌شوند. نکته بسیار مهم این است که در پایان کار حتماً لوپ استریل شود.



شکل۱-۳:کشت به روش ایزولاسیون

کشت جهت شمارش کلنی‌ها بر روی محیط آگار:

معمولاً جهت کشت ادرار استفاده می‌شود.توسط یک لوپ کالیبر شده استریل که می‌تواند حجم معینی از ادرار (ml ۰/۰۰۱ – ۰/۰۱) برداشت نماید، انجام می‌شود. (شکل۲-۳)



شکل ۲-۳:کشت به روش Streaking جهت شمارش تعداد باکتری‌ها

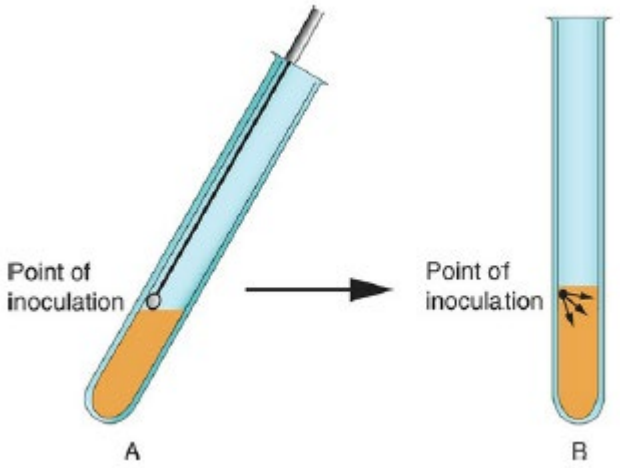
ابتدا لوپ را به صورت عمودی وارد نمونه ادرار نموده و سپس تمامی محلول برداشت شده توسط لوپ با کشیدن یک خط در مرکز پلیت محیط آگار، بر روی سطح محیط تخلیه می‌شود. سپس با کشیدن خطوط رفت و برگشت، نمونه قرار گرفته درروی خط کشت را در سطح پلیت کشت می دهیم، سپس پلیت را ۹۰ درجه چرخانده و همین عمل را تکرار می‌کنیم .در انتهای کار فیلد ویلاتین باید استریل شود. در برخی آزمایشگاه‌ها دو کشت،یکی با حجم ۰/۰۱ml و دیگری با حجم ۰/۰۰۱ml جهت کنترل کیفی، کشت داده می‌شوند. البته امروزه ابزار دقیق تری برای برداشت حجم معینی از ادرار وجود دارد.

کشت در لوله‌های حاوی محیط کشت:

محیط‌های کشت داخل لوله‌ها می‌تواند، مایع، جامد و یا نیمه جامد باشند.

کشت در لوله حاوی محیط مایع

لوله باید در یک زاویه ۳۰ درجه خم شود ،درپوش آن را برداشته و دهانه آن را توسط شعله حرارت می دهیم . سپس نمونه مورد نظر را در محلی از مایع که در شکل نشان داده شده است به محیط مایع منتقل می‌کنیم(شکل ۳-۳).در لوله را از شعله گذرانده ودر پوش آن را می گذاریم. نکته مهم: لوپ در پایان کشت باید استریل شود.

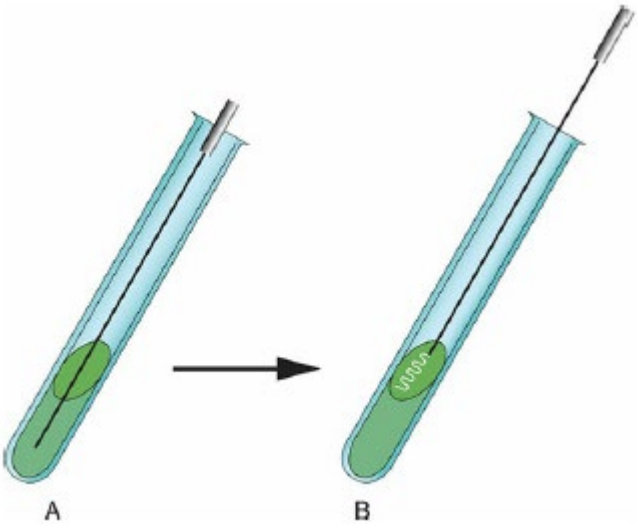


شکل۳-۳:کشت در محیط مایع

کشت در لوله حاوی محیط جامد شیب دار (Slant):

اگر هدف فقط کشت دربخش سطحی آن باشد، نمونه را توسط لوپ وارد لوله نموده و از کمی بالاتر از سطحی که شیب محیط شروع می‌شود به صورت خطوط زیگزاگی کشت می دهیم(شکل۴-۳).

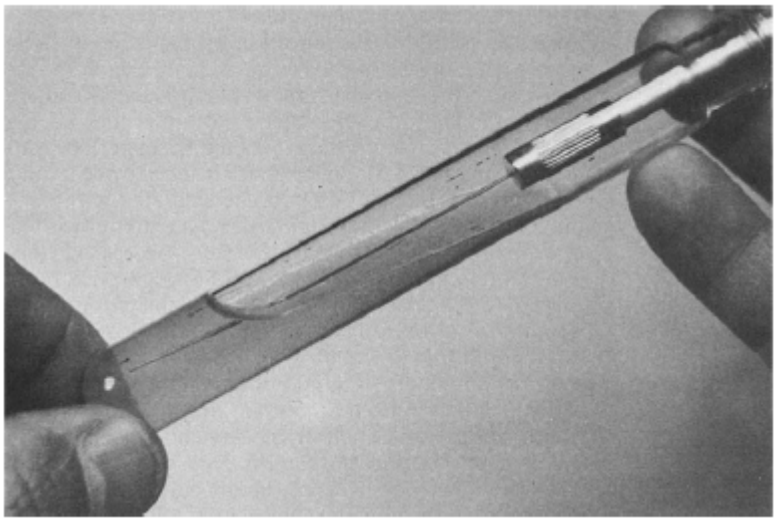
اگر هدف، کشت در عمق و سطح باشد، نمونه را با استفاده از Straight wire (یا شکل سوزنی لوپ) ابتدا وارد قسمت عمقی نموده و قبل از این که به انتها برسد، میله پلاتین را از بخش عمقی خارج نموده و در سطح به صورت زیگزاگ کشت می دهیم . نکته مهم لوپ در پایان کشت باید استریل شود .



شکل۴-۳:کشت عمقی و سطحی در لوله حاوی محیط جامد

کشت در لوله حاوی محیط نیمه جامد (Semisolid)

معمولاً این کشت برای بررسی توانایی حرکت باکتری استفاده می‌شود. به همین جهت نمونه را با یک میله پلاتین سوزنی وارد محیط کشت نموده و قبل از رسیدن به انتهای محیط کشت در همان راستا خارج می نمائیم .نکته مهم، لوپ در پایان کشت باید استریل شود(شکل۵- ۳).



شکل۵-۳:کشت در محیط نیمه جامد

دما، اتمسفر و رطوبت مناسب جهت رشد باکتری‌ها

میکروارگانیسم‌ها جهت رشد ،نیازبه دمای مناسب دارند. برخی در طیف گسترده ای از دما توانایی رشد دارند ،در حالی که این طیف برای برخی دیگربسیار محدود است. دمای مناسب برای رشد بیشتر میکروارگانیسم‌های ۳۵°C سانتیگراد می‌باشد.

رشد بیشتر میکروارگانیسم‌ها توسط ٪ ۱۰- ۵ Co_2 افزایش می یابد. همچنین بیشتر باکتری‌ها در رطوبت ٪ ۷۰یا بالاتر بهتر رشد می‌کنند.

تفسیر نتایج کشت:

معمولا نتایج کشت باکتری‌ها 48-24 ساعت پس از گرما گذاری قابل بررسی است. تفسیر نتایج نیاز به مهارت داشته و یک میکربشناس باید از اولین مشاهده، کلنی‌های ایزوله شده را ارزیابی کند و تصمیم گیری نماید چه مسیرهایی برای شناسایی آن‌ها مورد نیاز می‌باشد.

مشخصات کلنی‌ها، تعداد کلنی‌ها، خلوص کلنی باکتری‌های رشد یافته، نتیجه رنگ آمیزی گرم کلنی، تغییرات قابل مشاهده در محیط کشت مانند تغییر رنگ و... فاکتورهای مؤثر در ارزیابی کلنی‌ها و تصمیم گیری برای مراحل شناسایی می‌باشند.

مشخصات ماکروسکوپی کلنی:

در کشت نمونه‌های بالینی ممکن است هم زمان چند نوع کلنی باکتری مشاهده شوند.پلیت کشت شده را در دست گرفته و در چند جهت در مقابل نور، کلنی‌ها بررسی می‌شوند.

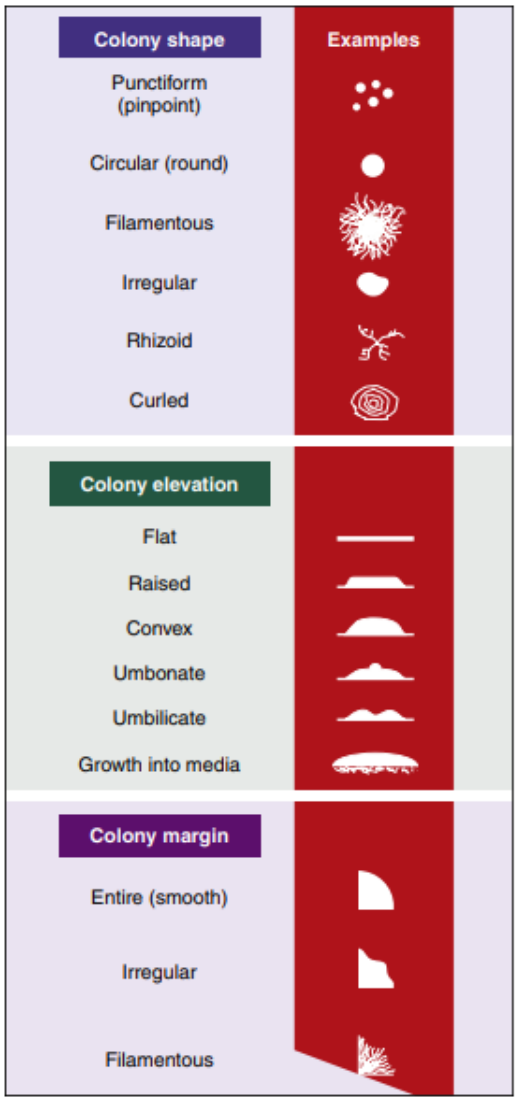
می‌توان از یک عدسی دستی یا میکروسکوپ نیز برای دیدن کلنی‌ها استفاده کرد. البته برای نمونه‌های پر خطر باید شرایط محافظت به دقت انجام شود. مشخصات کلنی که در شناسایی استفاده می‌شود،عبارتند از:

۱- اندازه ۲- شکل ۳- تحدب ۴- حاشیه ۵- رنگ ۶- سطح ۷- چگالی ۸- قوام

شکل کلنی‌ها:

کلنی‌ها اشکال متفاوتی دارند ، می‌توانند گرد،ریزوئیدی، نامنظم و ... باشند (شکل ۶-۳).هم چنین حاشیه کلنی‌ها نیز می‌تواند اشکال مختلفی داشته باشد کامل، رشته ای و...

برخی از باکتری‌ها بوی خاصی تولید می‌کنند، لازم به ذکر است جهت پیشگیری از عفونت نباید پلیت‌ها را استشمام کرد.



(شکل ۶-۳) اشکال مختلف کلنی‌ها،سطح و حاشیه آنها

واکنش باکتری‌ها در محیط های کشت

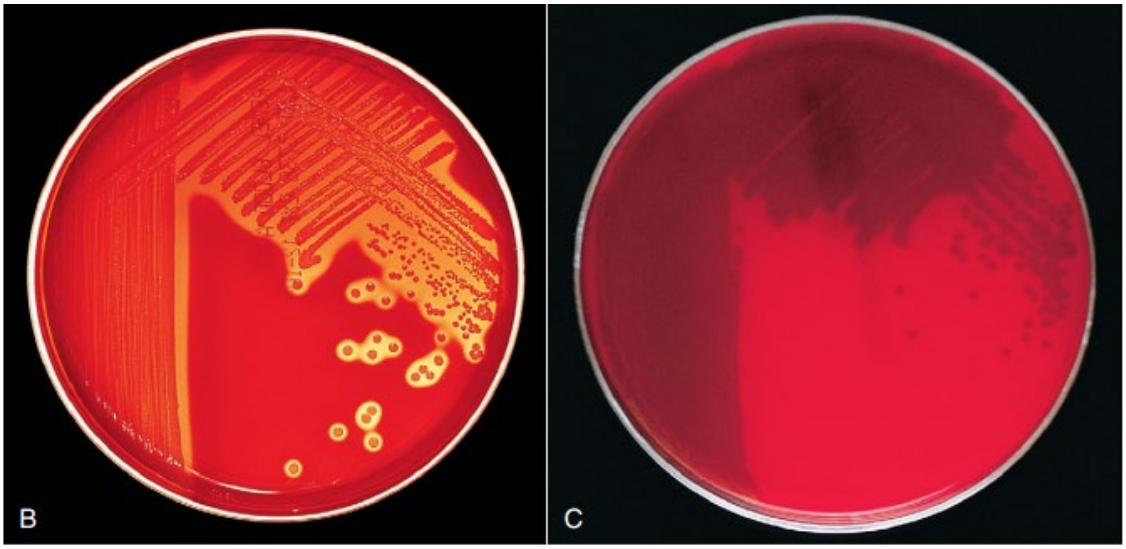
همولیز روی محیط بلاد آگار

برخی از باکتری‌ها قادرند تا با تولید موادی ،گلبول‌های قرمز خون را لیز(تخریب) نمایند(شکل ۷-۳).

همولیز آلفا: اگر اطراف کلنی‌ها، لیز گلبولهای قرمز در حد جزئی و متمایل به رنگ سبز باشد.

همولیز بتا: اگر اطراف کلنی لیز گلبول‌های قرمز کامل و اطراف کلنی شفاف باشد.

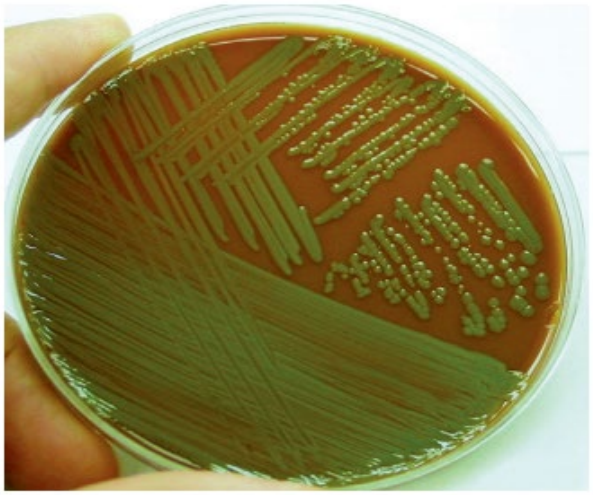
همولیز گاما: هیچ تغییری در اطراف کلنی مشاهده نشود.



(شکل ۷-۳): کشت در بلاد آگار، **B** همولیز بتا و **C** همولیز آلفا

تولید پیگمان (رنگدانه) در محیط آگار:

برخی باکتری‌ها پیگمان‌های متفاوتی در محیط کشت ایجاد می‌کنند،مانند پیگمان های سبز تا قهوه ای سودوموناس یا پیگمان کرم طلایی استافیلوکوکوس اورئوس(شکل ۸-۳):



(شکل ۸-۳) تولید پیگمان سبز توسط باکتری

تغییرات در محیط‌های افتراقی:

مانند تغییر رنگ‌ها، معرف‌های pH و سایر تغییراتی که توسط معرف‌های فعالیت‌های آنزیمی در محیط ایجاد می‌شود (شکل ۹-۳).

(شکل ۹-۳): تغییر رنگ محیط کشت

لوله **B** : محیط کشت اولیه لوله**A** : تغییر رنگ محیط اولیه به رنگ صورتی

در نهایت اگر در محیط کشت ،کلنی‌های متفاوت ،قابل تمایز از هم نباشند می‌توان به روش‌های زیر کشت خالص تهیه نمود:

۱- برداشت از سطح یک کلنی و کشت مجدد آن در پلیت دیگر

۲- استفاده از محیط انتخابی

۳- استفاده از مواد شیمیایی ممانعت کننده

۴- استفاده از دیسک‌های آنتی بیوتیک

نکته قابل توجه این است که کلنی باید خالص باشد تا بتوان مراحل بعدی شناسایی را ادامه داد.

مشخصات فوق کمک می‌کنند تا با استفاده از محیط‌های کشت افتراقی و سایر آزمایشات ،شناسایی باکتری نهایی شود.

پس از دستیابی به کلنی خالص ،می‌توان از روش‌های مختلف مانند روش‌های ملکولی وابسته به DNA، اسپکترومتری (Mass spectrometry) و....در شناسایی باکتری استفاده نمود.

جلسه چهارم: شناسایی باکتری‌ها (کوکسی‌های گرم مثبت)

دستور کار :

۱- تفسیر نتایج جلسه قبل

۲- رنگ آمیزی گرم از کلنی‌های کشت جلسه قبل

۳- مشاهده آزمایش کاتالاز

۴- کشت در محیط مولر هینتون آگارجهت آزمایش حساسیت به باسیتراسین

۵- کشت در پلاسمای رقیق شده جهت آزمایش کواگولاز

۶- کشت در محیط بلاد آگار جهت آزمایش همولیز ،حساسیت به اپتوچین و باسیتراسین

۷- کشت در محیط بلاد آگار جهت آزمایش کمپ

۸- کشت در محیط بایل اسکولین

۹-کشت در محیط مایع حاوی نمک ۶/۵٪و فاقد آن

۱۰- مشاهده میکروسکوپی استرپتوکوک در گسترش تهیه شده از محیط کشت مایع به روش گرم

۱۱- مشاهده میکروسکوپی دیپلوکوک گرم مثبت در گسترش تهیه شده از نسج به روش گرم (مثال پنوموکوک)

۱۲- مشاهده میکروسکوپی دیپلوکوک گرم منفی در گسترش تهیه شده از نسج به روش گرم (مثال نایسریا گونوره آ-نایسریا مننژیتیدیس)

۱۳-مشاهده استافیلوکوکوس درگسترش تهیه شده از چرک

۱۴- مشاهده استافیلوکوکوس درگسترش تهیه شده از محیط کشت

شناسایی باکتری‌ها با استفاده از روش‌های متعددی انجام می‌شود.امروزه در آزمایشگاه‌های مجهز، کلنی‌های خالص میکرو ارگانیسم با استفاده از اسپکترومتری (Maas spectrometry) مستقیماً شناسایی می‌شوند. اگرچه این روش صرفه جویی در زمان و هزینه‌ها می‌باشد ،ولی روش ایده آلی نیست. روش دیگر شناسایی میکروارگانیسم ها استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی آن‌ها است. این روش نیاز به وقت و هزینه بیشتری دارد ،ولی دقت بالایی دارد.

مشاهده‌ی محیط‌های کشت اولیه و تفسیر آن‌ها به شناسایی میکروارگانیسم‌های کمک می‌کند.

در این روش ،کلنی‌های خالص باکتری‌ها پس از رنگ آمیزی به روش گرم، با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی شناسایی شده و در نهایت جهت حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها بررسی خواهند شد.

در این آزمایشگاه روش دوم آموزش داده خواهد شد.

با استفاده از رنگ آمیزی گرم، باکتری‌ها به دو گروه بزرگ باکتری‌ها ی گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی تقسیم می‌شوند.

باکتری‌های گرم مثبت:

این باکتری‌ها،در طبیعت به طور گسترده ای وجود دارند، همچنین از بدن انسان و حیوانات نیز جداسازی می‌شوند. به همین علت شناسایی و معرفی آن‌ها به عنوان عامل یک بیماری عفونی کار مشکلی می‌باشد.

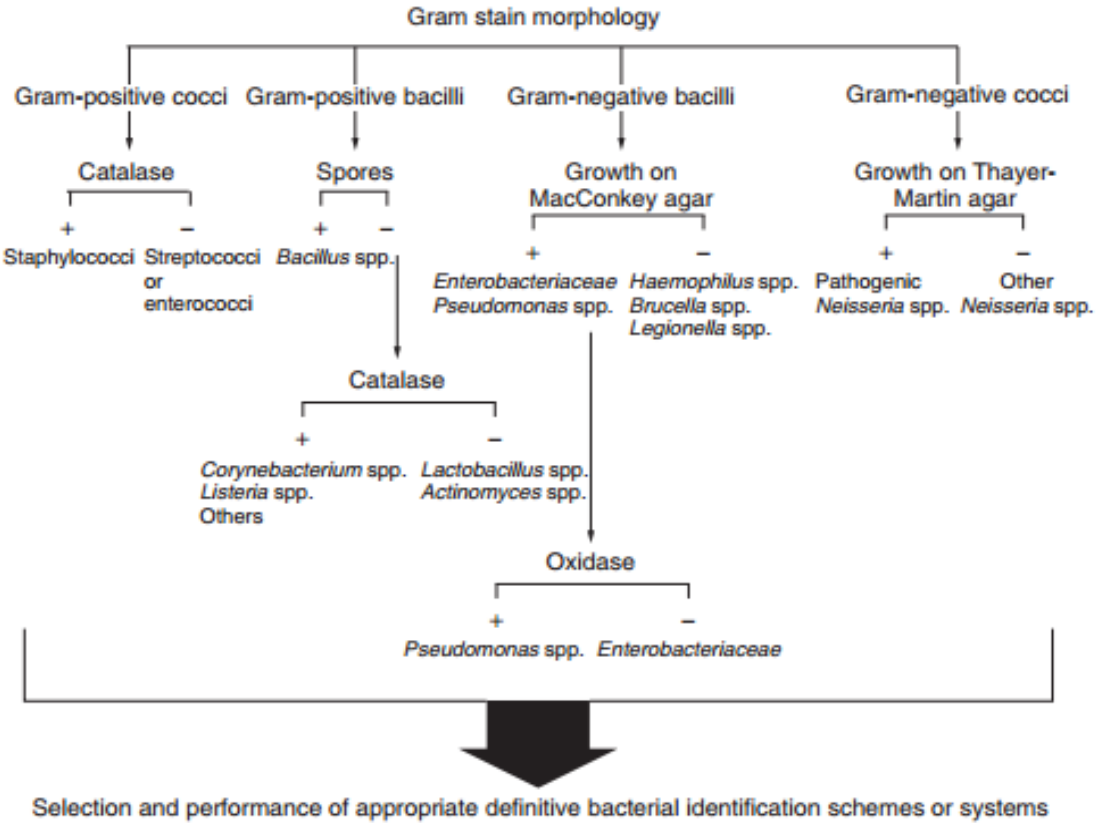
باکتری‌های گرم مثبت با استفاده از مورفولوژی (شکل شناسی) به دو گروه کوکسی‌های گرم مثبت و باسیل‌های گرم مثبت تقسیم بندی می‌شوند. با توجه به اهمیت کوکسی‌های گرم مثبت در نمونه‌های عفونی به روش زیر به شناسایی آن‌ها می‌پردازیم (شکل ۱-۴)

Morphotype Description	Most Common Organisms
Bacteria	
Cocci	
Gram-positive cocci	*Aerococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Planococcus, Staphylococcus, Stomatococcus, Streptococcus* spp.
Gram-positive cocci	
Pairs	*Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus* spp.
Tetrads	*Micrococcus, Staphylococcus, Peptostreptococcus* spp.
Groups	*Staphylococcus, Peptostreptococcus, Stomatococcus* spp.
Chains	*Streptococcus, Peptostreptococcus* spp.
Clusters, intracellular	Microaerophilic *Streptococcus* spp., viridans streptococci, *Staphylococcus* spp.
Encapsulated	*Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes* (rarely), *Stomatococcus mucilaginosus*
Gram-positive diplococci (lancet-shaped)	*Streptococcus pneumoniae*
Gram-negative diplococci	Pathogenic *Neisseria* spp., *Moraxella catarrhalis*
Bacilli	
Gram-positive bacilli	
Small	*Listeria monocytogenes, Corynebacterium* spp.
Medium	*Lactobacillus*, anaerobic bacilli
Large	*Clostridium, Bacillus* spp.
Diphtheroid	*Corynebacterium, Propionibacterium, Rothia* spp.
Pleomorphic, gram-variable	*Gardnerella vaginalis*
Beaded	Mycobacteria, antibiotic-affected lactobacilli, and corynebacteria
Filamentous	Anaerobic morphotypes, antibiotic-affected cells
Filamentous, beaded, branched	*Actinomycetes, Nocardia, Nocardiopsis, Streptomyces, Rothia* spp.
Bifid or V forms	*Bifidobacterium* spp., brevibacteria
Gram-negative coccobacilli	*Bordetella, Haemophilus* spp. (pleomorphic)
Masses	*Veillonella* spp.
Chains	*Prevotella, Veillonella* spp.
Gram-negative bacilli	
Small	*Haemophilus, Legionella* (thin with filaments), *Actinobacillus, Bordetella, Brucella, Francisella, Pasteurella, Capnocytophaga, Prevotella, Eikenella* spp.
Bipolar	*Klebsiella pneumoniae, Pasteurella* spp., *Bacteroides* spp.
Medium	Enterics, pseudomonads
Large	Devitalized clostridia or bacilli
Curved	*Vibrio, Campylobacter* spp.
Spiral	*Campylobacter, Helicobacter, Gastrobacillum, Borrelia, Leptospira, Treponema* spp.
Fusiform	*Fusobacterium nucleatum*
Filaments	*Fusobacterium necrophorum* (pleomorphic)

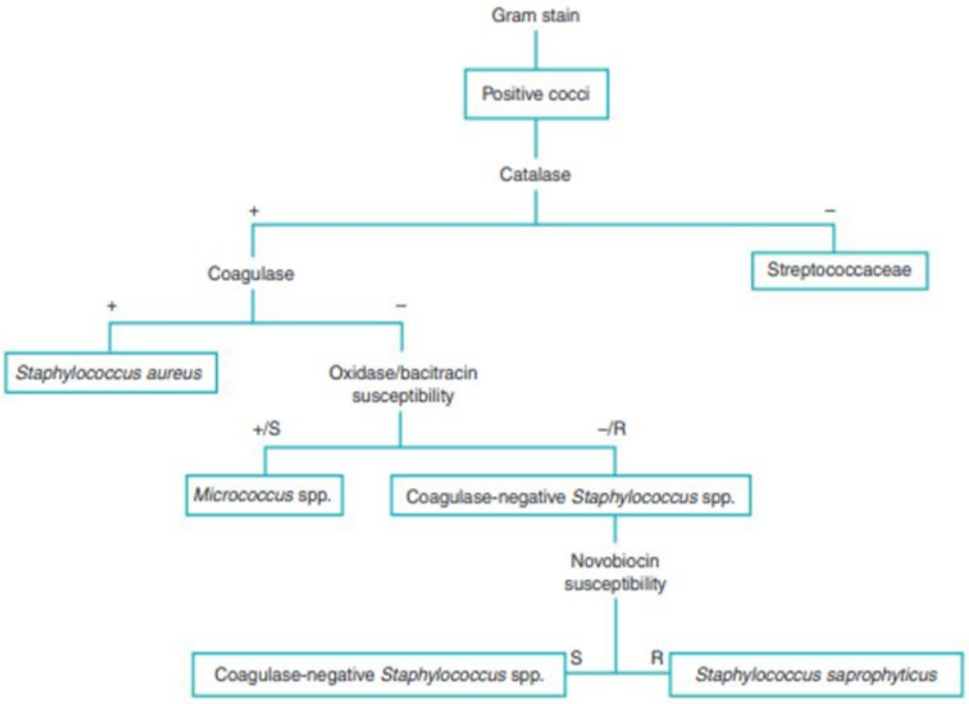
(شکل ۱-۴): تقسیم بندی باکتری‌ها بر اساس رنگ آمیزی گرم

کوکسی‌های گرم مثبت:

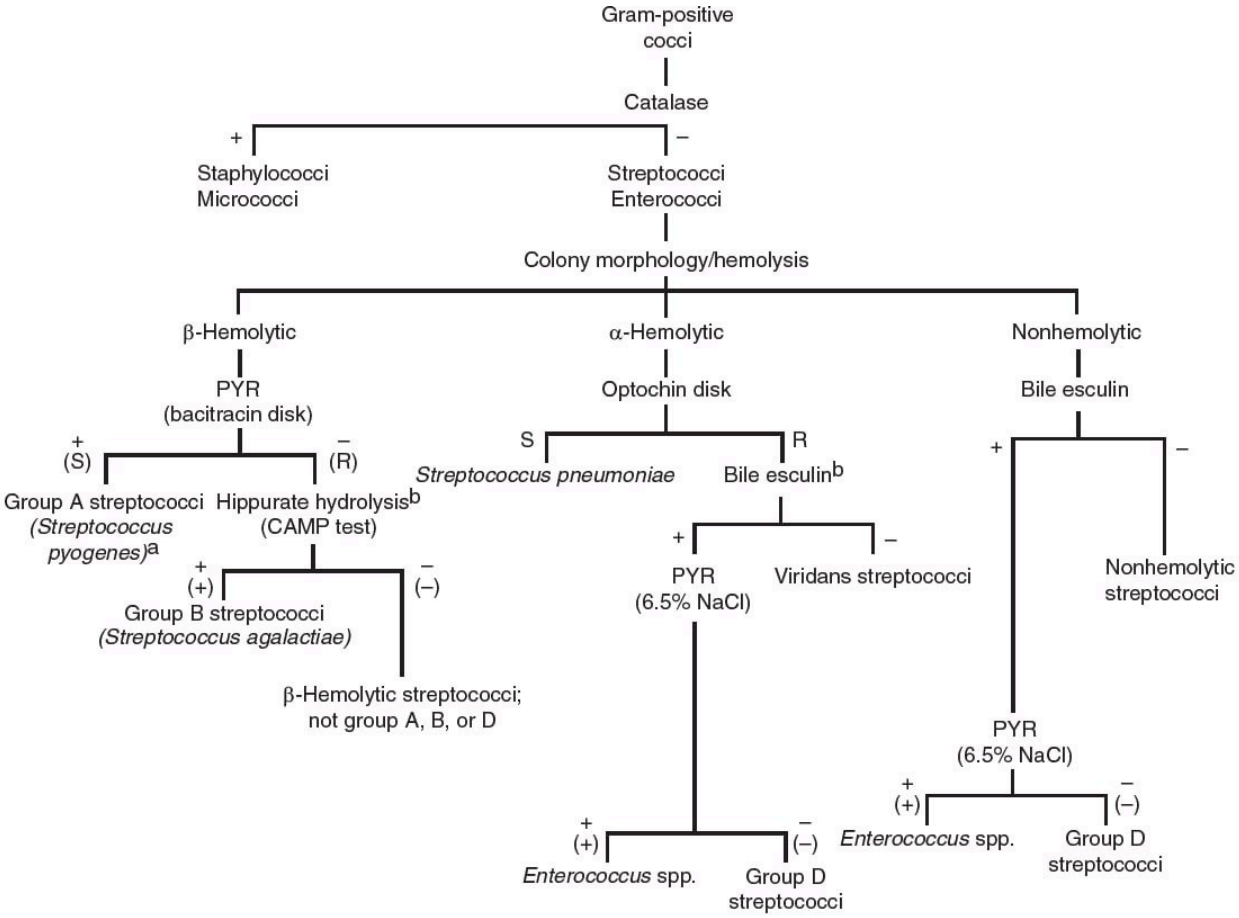
کوکسی‌های گرم مثبت ، تنوع زیادی دارند. این باکتری‌ها زیر میکروسکوپ به شکل کروی یا بیضوی بوده و آرایش متفاوتی دارند. می‌توانند به شکل مونوکوک، دیپلوکوک ،استرپتوکوک و استافیلوکوک دیده شوند. بیشتر انواع بیماری‌زای آن‌ها در دو خانواده بزرگ میکروکوکاسیه (Micrococcaceae) و استرپتوکوکاسیه(Streptococcaceae) قرار دارند. ابتدا از کلنی باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت، گسترش تهیه و سپس به روش گرم رنگ آمیزی می‌شود. در صورتی که در گسترش، کوکسی‌های گرم مثبت مشاهده شوند، با آزمایشات زیر به شناسایی آن‌ها می‌پردازیم(شکل ۲-۴، (شکل ۴-۳).



شکل (۲-۴): تقسیم بندی اولیه باکتری‌ها پس از رنگ آمیزی گرم

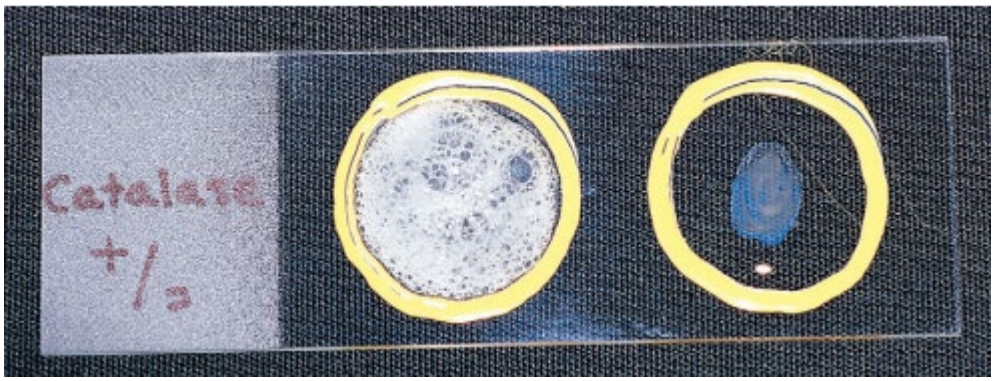


شکل ۳-۴: شناسایی کوکسی‌های گرم مثبت (۱)



شکل ۳-۴: شناسایی کوکسی‌های گرم مثبت (۲)

آزمایش کاتالاز:



(شکل ۴-۴): کاتالاز مثبت(سمت چپ تصویر)، کاتالاز منفی(سمت راست تصویر)

هدف:

هدف از این آزمایش جداسازی خانواده میکروکوکاسیه (میکروکوک و استافیلوکوک) از خانواده استرپتوکوکاسیه می‌باشد.

پایه و اساس آزمایش:

باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری در مسیر متابولیسم طبیعی خود توکسین هایی تولید می‌نمایند،مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال سوپر اکسید (O_2^-).

این دسته از باکتری‌ها جهت خنثی سازی این توکسین‌ها ،دو آنزیم تولید می‌کنند .یکی از این آنزیم‌ها، کاتالاز است که قادر است پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) را به آب و اکسیژن(حباب گاز)تجزیه نماید:

(شکل ۴-۴): $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

روش کار:

یک قطره از پراکسید هیدروژن ۳٪ با کلنی در تماس قرار می‌گیرد.

محدودیت‌ها:

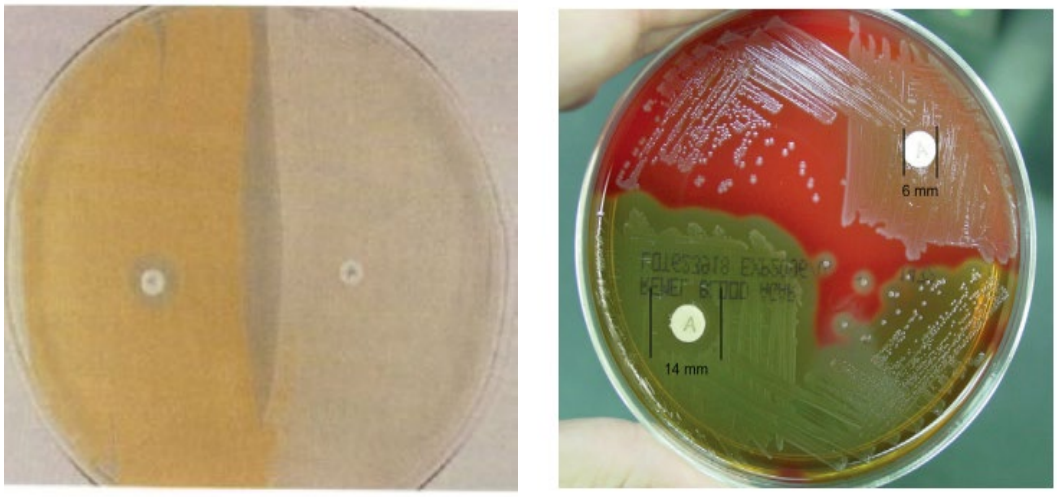
۱-اگر محیط کشت باکتری، بلادآگار باشد ممکن است نتیجه مثبت کاذب به دست آید ،چون گلبول‌های قرمز حاوی کاتالاز بوده و در تماس با آب اکسیژنه واکنش مثبت ضعیفی ایجاد می‌کنند.

۲-برخی از انتروکوک‌ها (خانواده استرپتوکوکاسیه)، پراکسیدازی تولید می‌کنند که خیلی آهسته پراکسید هیدروژن را می شکند و واکنش ضعیفی ایجاد می‌کند.

نتیجه:

خانواده میکروکوکاسیه (استافیلوکوک، میکروکوک) با ایجاد حباب‌های اکسیژن، نتیجه مثبت و استرپتوکوکوکاسیه با عدم ایجاد حباب یا واکنش بسیار ضعیف، نتیجه منفی خواهند داشت.

آزمایش حساسیت به باسیتراسین:



A B

(شکل ۵-۴):**A**:حساسیت به باسیتراسین: افتراق استافیلوکوک از میکرو کوک (هاله عدم رشد اطراف دیسک نشان دهنده حساسیت میکروکوک می‌باشد)

B: حساسیت به باسیتراسین: افتراق استرپتوکوک گروه **A** ازسایر استرپتوکوک ها دارای همولیز بتا

هدف:

هدف از این آزمایش ، تمایز گونه‌های استافیلوکوک از میکروکوک‌ها می‌باشد، هم چنین درتشخیص استرپتوکوک گروه A (پیوژنز) از سایرانواع استفاده می‌شود.

پایه و اساس آزمایش:

آنتی بیوتیک باسیتراسین سنتز دیواره سلولی باکتری‌ها را مهار می‌کند (**شکل ۵-۴**).

روش کار: جهت بررسی حساسیت به باسیتراسین، استافیلوکوک‌ها و میکروکوک‌ها بر روی محیط مولرهینتون آگار کشت داده می‌شوند . جهت افتراق انواع استرپتوکوک‌ها کشت بر روی محیط بلادآگار انجام می‌شود.

سپس یک دیسک باسیتراسین (حاوی ۰/۰۴ واحد باسیتراسین) را بر روی کشت قرار داده و در گرمخانه °C ۳۷ - ۳۵ به مدت ۲۴-۱۸ ساعت قرار می دهیم (برای استرپتوکوک‌ها CO_2 ٪۱۰ - ۵ ٪نیاز می‌باشد).

محدودیت‌ها:

۱- این آزمایش در شناسایی انواع استرپتوکوک‌ها، خیلی اختصاصی نمی‌باشد. به طوری که به جز استرپتوکوک گروه A ، ۱۰ ٪ از استرپتوکوک‌های گروه C و G و ۵ ٪ از استرپتوکوک‌های گروه B نیز به باسیتراسین حساسیت نشان می‌دهند.

۲- همچنین نحوه نگهداری و تاریخ مصرف دیسک ، در نتایج مؤثر است و باید در نظر گرفته شود.

نتیجه:

۱- افتراق استافیلوکوک و میکروکوک:

میکروکوک‌ها به این آنتی بیوتیک حساس هستند و استافیلوکوک‌ها مقاوم می‌باشند.هاله عدم رشد کمتر از ۱۰ میلی متر مقاوم و هاله مساوی یا بزرگتر از ۱۰ میلی متر حساس تلقی می شود.

۲- افتراق انواع استرپتوکوک‌ها:

استرپتوکوک گروه A ، ۱۰ ٪ از استرپتوکوک‌های گروه C و G و ۵ ٪از استرپتوکوک‌های گروه B حساس هستند ، که با آزمایشات دیگر افتراق داده خواهند شد .نتیجه منفی زمانی است که‌هاله عدم رشد وجود ندارد.

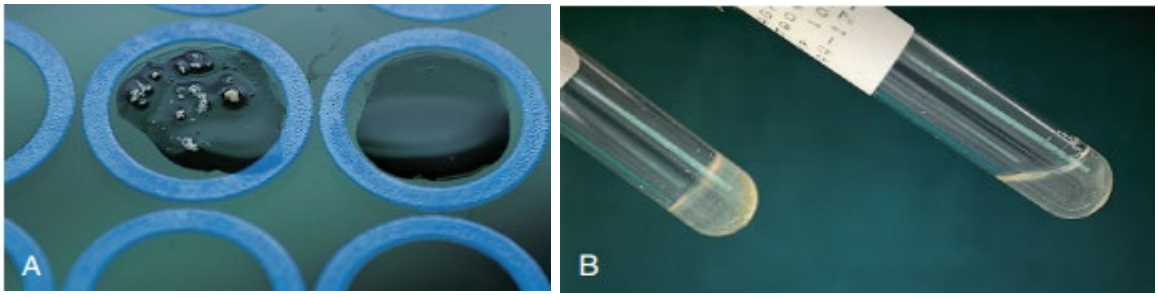
افتراق استافیلوکوک ها

آزمایش کواگولاز:

هدف:

از این آزمایش ،جهت افتراق استافیلوکوک های کواگولاز مثبت مانند استافیلوکوک اورئوس از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی استفاده می‌شود

(شکل۶-۴).



شکل۶-۴: آزمایش کواگولاز.

A:کواگولاز باند (متصل)، تست لامی، B: کواگولاز آزاد، تست لوله ای

پایه و اساس آزمایش:

استافیلوکوک اورئوس دو شکل از آنزیم کواگولاز را تولید می‌کند.که شامل کواگولاز باند(Clumping Factor) و کواگولاز آزاد می‌باشد.کواگولاز باند متصل به سلول باکتری است و مستقیماً با فیبرینوژن واکنش می‌دهد و با روش آزمایش بر روی لام (Slide test) بررسی می‌شود.

کواگولاز آزاد به روش آزمایش لوله (Tube test) بررسی می‌شود. که در اثر عملکرد آنزیم کوالاگولاز بر روی فیبرینوژن، لخته (فیبرین) تشکیل می‌شود(شکل۶-۴).

روش کار آزمایش کواگولاز آزاد:

چند کلنی باکتری را در ۰/۵ میلی لیتر از پلاسمای رقیق شده خرگوش (به وسیله EDTA) مخلوط کرده تا یک امولسیون شیری رنگ به دست آید. سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۵-۳۷°C گرماگذاری می‌کنیم. پس از ۴ ساعت اگر لخته ای تشکیل نشد، لوله در دمای اتاق تا ۲۴ ساعت نگهداری نموده و مجدداً حضور لخته بررسی می‌شود.

محدودیت‌ها:

در آزمایش کواگولاز آزاد، لخته می‌تواند در ۴ ساعت تشکیل شود و اگر ۲۴ ساعت گرماگذاری شود ممکن است این لخته از بین برود.

نتیجه:

ایجاد لخته (فیبرین) نتیجه مثبت این آزمایش می‌باشد ، این آنزیم توسط استافیلوکوک اورئوس و تعدادی دیگر از استافیلو کوک‌ها تولید می‌شود.

نتیجه منفی زمانی است که لخته مشاهده نشود.

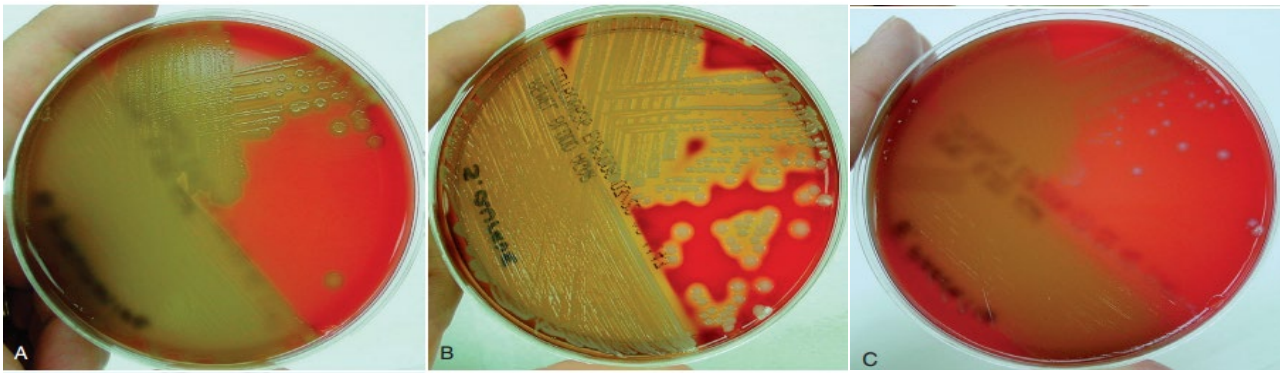
آزمایش همولیز:

هدف:

هدف تقسیم بندی انواع استرپتوکوک‌ها بر اساس نوع همولیز آن‌ها می‌باشد.

پایه و اساس آزمایش:

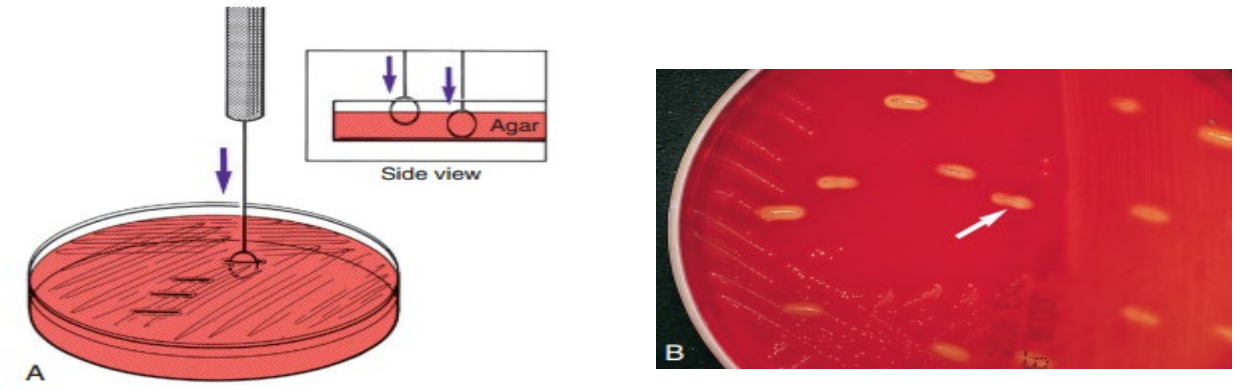
استرپتوکوک ها با تولید موادی مانند استرپتولیزینO (Oxygen-labile) ،استرپتولیزین S (Oxygen-Stable) و پراکسید هیدروژن قادر می‌باشند ،گلبول‌های قرمز محیط بلادآگار را لیز نمایند (شکل۷-۴).استریتولیزین s مقاوم به اکسیژن می‌باشد، در نتیجه در کشت سطحی هم قابل مشاهده است .ولی استریپتولیزین O که حساس به اکسیژن است در شرایط بی‌هوازی عمل می‌کند، به همین جهت در قسمت Stab (عمقی) محیط بلادآگار عمل می‌کند(شکل ۸-۴).



شکل۷-۴: انواع همولیز. **A**: همولیز آلفا ، **B**: همولیز بتا، **C**: واکنش گاما (عدم همولیز)

روش کار:

باکتری به روش streak-stab (شکل ۸-۴) بر روی پلیت بلاد آگار کشت داده می‌شود. به طوری که پس از مرحله نهایی کشت ، لوپ به صورت عمقی وارد محیط کشت می‌شود (stab). به این ترتیب محیط بدون اکسیژن جهت فعالیت استرپتولیزین O (حساس به اکسیژن) فراهم می‌گردد. پلیت در دمای ۳۵ °C در حضور ۵٪ تا ۷٪ CO_2 یا هوای معمولی به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری می‌شود.



شکل(۸-۴): روش کشت **Streak-stab** برای مشاهده همولیز

محدودیت‌ها:

در اتمسفر بی‌هوازی بتاهمولیز افزایش می یابد، به همین جهت عموماً کشت در اتمسفر هوا ولی به روش Streak-stab انجام می‌شود.

نتیجه:

جهت بررسی همولیز، می توان کلنی باکتری را با فیلدوپلاتین کنار زد ومحیط را از نظر میزان همولیز بررسی نمود،بهتر است پلیت مقابل نور گرفته شود.

همولیز آلفا (α): لیز جزئی گلبول‌های قرمز باعث تولید رنگ خاکستری مایل به سبز یا متمایل به قهوه ای در اطراف کلنی می‌شود.

همولیز بتا (β): لیز کامل گلبول‌های قرمز باعث ایجاد یک هاله شفاف در زیر و اطراف کلنی می‌شود.

غیر همولتیک (NonHemolytic):

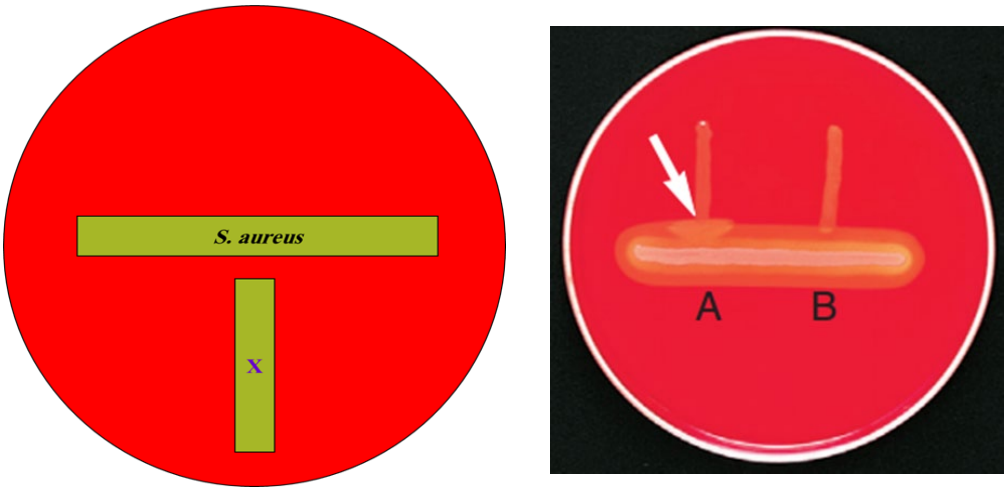
لیز گلبول قرمز انجام نمی‌گیرد و در نتیجه تغییری در زیر و اطراف کلنی ایجاد نمی‌شود.

آزمایش کمپ (CAMPT test)

نام این آزمایش از حروف ابتدای اسامی ابداع کنندگان (Christie–Atkins–Munch-Peterson) این روش گرفته شده است.

هدف:

جهت افتراق استرپتوکوک‌های گروه **B** (استرپتوکوک آگالاکتیه) از سایر استرپتوکوک‌های دارای همولیز بتا استفاده می‌شود.



شکل ۹-۴ : آزمایش کمپ : **A**:کمپ مثبت، **B**: کمپ منفی

پایه و اساس:

باکتری‌هایی که در این آزمایش نتیجه مثبت دارند، توانایی تولید یک پروتئین همولیتیک خارج سلولی **(CAMP factor)** را دارند که می‌تواند در محیط کشت منتشر شود. اگر این پروتئین در مجاورت بتالیزین استافیلوکوک اورئوس قرار بگیرد، اثر همولتیکی تشدید می‌شود. در این حالت اگر باکتری را در مجاورت استافیلوکوک اورئوس و عمود بر آن کشت دهید واکنش مثبت به صورت یک کمان یا فلش که همولیز کامل دارد مشاهده می‌شود (شکل۹-۴).

روش

بر روی محیط کشت بلاد آگار یک خط از استافیلوکوک اورئوسی که توانایی تولید بتا لیزین را دارد، کشت داده شود. عمود بر این خط کشت ، باکتری مورد نظر را کشت داده ،به طوریکه با خط کشت استافیلوکوک اورئوس تلاقی نداشته باشد (۲ میلی متر فاصله مناسب است) (شکل۹-۴ تصویر سمت راست) .در دمای $^{\circ}C$ ۳۵-۳۷ به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شود.

نتیجه

نتیجه مثبت: همولیز بتا یا کامل به شکل کمان یا فلش در محل تقاطع کشت استافیلوکوک اورئوس و استرپتوکوک (شکل۹-۴)

نتیجه منفی: عدم افزایش همولیز

محدودیت‌ها:

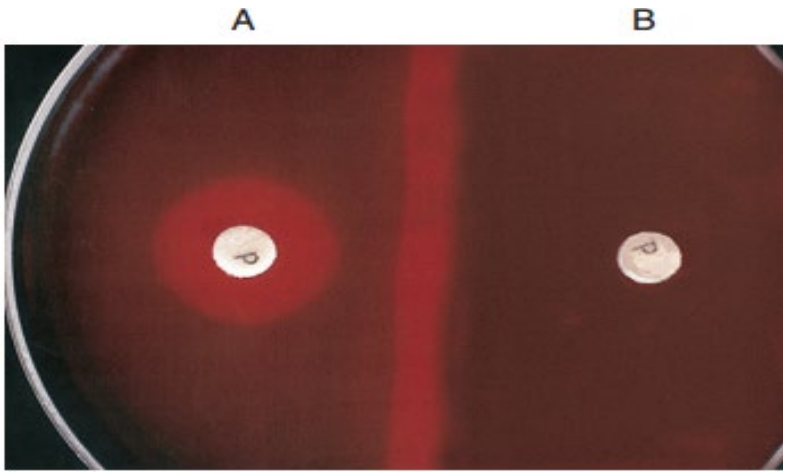
درصد بسیار کمی از استرپتوکوک‌های گروه **A** نیز ممکن است واکنش کمپ مثبت داشته باشند. به همین جهت این آزمایش فقط برای استرپتوکوک‌هایی که همولیز ندارند یا همولیز خیلی ضعیفی دارند و همچنین کلنی‌هایی که از نظر مورفولوژی به استرپتوکوک گروه **B** نزدیک می‌باشند ،انجام شود.

حساسیت به اپتوچین (Ethyl hydrocupreine hydro chloride)

پایه و اساس آزمایش:

هدف: شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه از سایر استرپتوکوک‌ها

آنتی بیوتیک اپتوچین با تداخل در عملکرد آنزیم ATPase، می‌تواند از رشد برخی باکتری‌ها ممانعت نماید (شکل ۱۰-۴).



شکل ۱۰-۴: آزمایش حساسیت به دیسک اپتوچین

A: حساس به اپتوچین (استرپتوکوکوس پنومونیه)، **B**: مقاوم به اپتوچین

روش:

دو الی سه کلنی از باکتری ، بر روی محیط بلادآگار کشت داده شده ، سپس یک دیسک حاوی اپتوچین بر روی کشت باکتری قرار داده می‌شود.

در دمای ۳۵°Cدر حضور ۵٪ دی اکسید کربن به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرماگذاری و سپس‌هاله عدم رشد اطراف دیسک اندازه گیری می‌شود.

محدودیت‌ها:

برای باکتری‌هایی که قطرهاله عدم رشد آن‌ها کمتر از ۱۴ میلی متر می‌باشد، باید با آزمایش حلالیت صفرا جهت شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه بررسی شوند.

نتیجه:

هاله عدم رشدبزرگتر یا مساوی ۱۴ میلی متر، نتیجه مثبت در نظر گرفته می‌شود.

نتیجه منفی زمانی است که‌هاله عدم رشد وجود نداشته باشد.

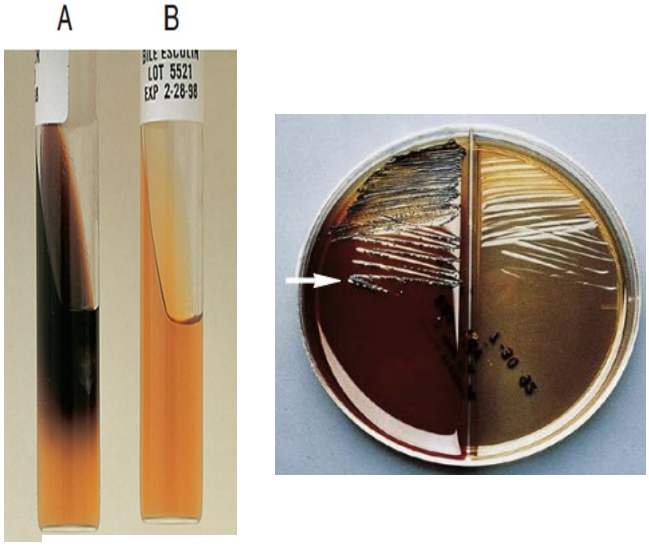
آزمایش هیدرولیز بایل اسکولین:

هدف:

افتراق انتروکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها ی گروه D از استرپتوکوک‌های ویریدانس غیر گروه D می‌باشد.

پایه و اساس آزمایش:

باکتری‌های گرم مثبت دیگر غیر از استرپتوکوک‌ها و انتروکوک‌ها قادر به رشد در حضور نمک‌های صفرا نیستند. باکتری‌هایی که قادر به رشد در حضور نمک‌های صفراوی(۴ ٪) هستند و می‌توانند اسکولین را به اسکولیتن هیدرولیز نمایند ، سبب ایجاد رنگ قهوه ای تیره یا سیاه (واکنش اسکولتین و Fe^{3+} محیط کشت) در محیط کشت می شوند (شکل ۱۱-۴).



شکل ۱۱-۴: آزمایش بایل اسکولین

A: مثبت، شکل **B**: منفی

روش کار:

یک تا دو کلنی خالص از باکتری در سطح محیط کشت داده شود و در دمای ۳۷-۳۵°C به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شود.

نتیجه:

نتیجه مثبت :رشد باکتری و ایجاد رنگ سیاه در محیط، نتیجه مثبت برای این آزمایش می‌باشد.

نتیجه منفی :رشد باکتری و عدم ایجاد رنگ سیاه نتیجه منفی برای این آزمایش می‌باشد.

محدودیت‌ها:

برخی از باکتری‌ها ممکن است در این محیط رشد ضعیفی داشته باشند یا نتوانند رشد کنند.

آزمایش تحمل نمک:

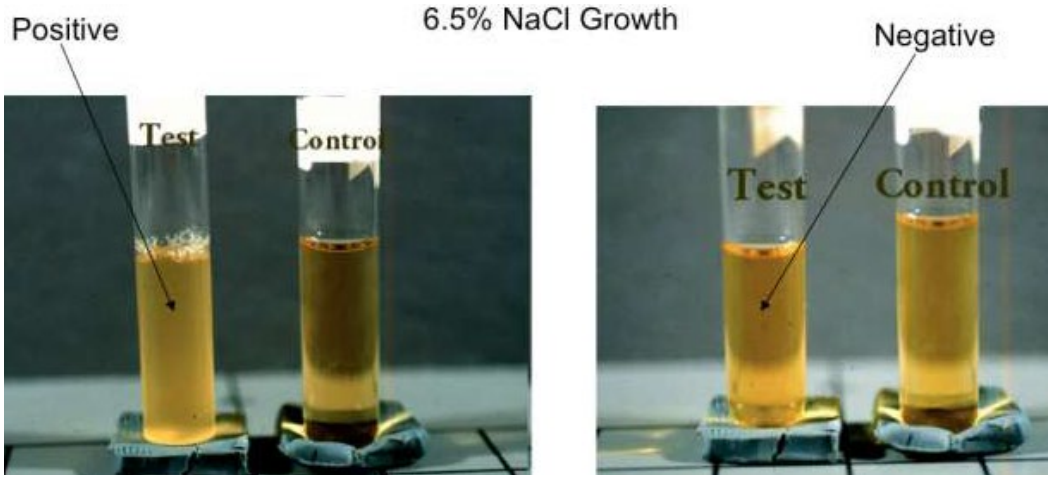
هدف: این آزمایش جهت بررسی توانایی رشد و تحمل غلظت بالای نمک (۶/۵ ٪) توسط باکتری استفاده می‌شود (شکل۱۲ -۴). با این روش انتروکوک‌ها که توانایی رشد در حضور نمک ۶/۵ ٪ را دارند، از استرپتوکوک‌های دیگر افتراق داده می‌شوند

پایه و اساس آزمایش:

انتروکوک‌ها قدرت تحمل بالای نمک و رشد در حضور آن را دارند.

روش:

یک تا دو کلنی از باکتری در محیط مایع حاوی ۶.۵٪ نمک تلقیح ودر دمای ۳۷°C-**35** به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شود.روزانه جهت مشاهده رشد باکتری بررسی شوند.



شکل۱۲-۴: آزمایش تحمل نمک

نتیجه:

مثبت: زمانی که کدورت رشد باکتری در محیط مشاهده شود.

منفی: زمانی که کدورت رشد باکتری در محیط مشاهده نشود.

جلسه پنجم:

بررسی سنجش حساسیت باکتری بیماری‌زا نسبت به داروهای ضدمیکربی (آنتی بیوگرام)

دستور کار :

۱- تفسیر آزمایشات شناسایی باکتری جلسه چهارم

۲- انجام آنتی بیوگرام برای باکتری شناسایی شده جلسه چهارم

نقش اولیه آزمایشگاه میکرب شناسی بالینی فراهم آوردن اطلاعات برای پزشکان است ،تا به وسیله این اطلاعات پزشک بتواند بیماری عفونی را شناسایی و درمان کند. این اطلاعات دارای دو قسمت بسیار مهم است که شامل:

۱-آیا یک عامل عفونی مطرح است؟

۲-کدام آنتی بیوتیک اثرات درمانی مناسبی را فراهم می آورد؟

ایفای صحیح این نقش مزایای فراوانی را به همراه می آورد. به بیان دیگر انتخاب آنتی‌بیوتیکی که برای درمان کاملا مناسب باشد باعث می‌شود که موارد زیر کاهش یابد:

۱- میزان مرگ و میر

۲- تعداد آزمایشات مورد نیاز

۳- تعداد روزهای بستری شدن در ICU

۴- طول زمان دریافت درمان آنتی‌بیوتیکی

۵- هزینه بیمارستان

بیشتر باکتری‌های بیماری‌زا می‌توانند فنوتیپ مقاومت نسبت به ترکیبات ضدمیکربی را به دست آورده و بروز دهند. مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها دخالت دارند.یافته‌های جدید نشان می‌دهند که بعضی آنتی بیوتیک‌ها باعث افزایش موقت میزان موتاسیون در باکتری‌ها می‌گردند. بدین ترتیب آنتی بیوتیک‌ها نه تنها به عنوان انتخاب کننده دسته‌های مقاوم باکتری فعالیت می‌کنند بلکه می‌توانند القا کننده ایجاد مقاومت نیز باشند.

در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای درمان عفونت، فاکتورهای زیادی باید مد نظر قرار بگیرد ،که تشخیص ارگانیسم عفونی و یا حداقل حدس مستدل آن و نیز اطلاعاتی در مورد حساسیت آن به آنتی بیوتیک‌ها دو فاکتور اصلی و اولیه آن است. سایر فاکتورها مربوط به بیمار مورد درمان است. این فاکتورها شامل:

۱- سابقه واکنش جانبی به ماده ضدمیکربی (مثل آلرژی به پنی سیلین)

۲- سن بیمار

۳- نابهنجاری‌های متابولیک و ژنتیکی بیمار

٤- بارداری بیمار

٥- عملکرد کبد و کلیه

٦- محل عفونت و انتشار آنتی بیوتیک در بافت و سلول‌های میزبان

۷- وضعیت سیستم ایمنی بیمار

۸- عفونت زایی و بیماری‌زایی باکتری

۹- - شدت بیماری

بنابراین میکرب شناس می‌تواند با بررسی آزمایشگاهی وضعیت مقاومت و یا حساسیت باکتری جدا شده از نمونه عفونی کمک بزرگی نماید. روش‌های مختلفی که برای سنجش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها به کار می‌روند به نام سنجش حساسیت ضدمیکربی (آنتی بیوگرام) نامیده می‌شوند. اولین شرکتی که تولید کننده مجموعه ای برای ارزیابی حساسیت باکتری‌ها به مواد ضدمیکربی بود، نام تجاری «آنتی بیوگرام» را بر آن نهاد.

استاندارد کردن آزمایش‌های حساسیت ضدمیکربی

به منظور جلوگیری از بروز خطا در آزمایشگاه و یا بین آزمایشگاه‌ها، روش‌های آزمایش باید کاملاً استاندارد باشند. رعایت استاندارد در موارد زیر ضروری است:

۱- مقدار باکتری تلقیح شده

۲- نوع محیط کشت (در بیشتر موارد محیط کشت مولر-هینتون آگار استفاده می‌شود)

۳- شرایط محیط کشت ازنظر pH، غلظت کاتیون‌ها،افزودنی‌هایی مانند خون و سرم

۴- اتمسفر انکوباسیون

۸- دمای انکوباسیون

۹- زمان انکوباسیون

۱۰- غلظت ماده ضدمیکربی

به منظور سنجش حساسیت ماده ضدمیکربی روش‌های مختلفی وجود دارد که سه روش آن در آزمایشگاه‌های بالینی بیشتر استفاده می‌شود که شامل:

۱- انتشار از دیسک (Disk Diffusion)

۲- رقت سازی سریال (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

۳-انتشار گرادیانت (E-test)

۱-روش انتشار از دیسک:

این روش برای نخستین بار توسط دانشمندانی به نام‌های Kirby و Bauer ارائه شد و به همین جهت نام دیگر روش انتشار دیسک، روش Kirby-Bauer است. در این روش از دیسک‌های کاغذی آغشته به آنتی بیوتیک استفاده می‌شود.

الف- مراحل انجام آزمایش انتشار از دیسک:

پس از شناسایی کامل یا اولیه باکتری(حداکثر ۱۸-۲۴ ساعت از کشت آن ها گذشته باشد) ، سوسپانسیونی از آن تهیه می شود. بدین منظور با استفاده از یک لوپ یا سواب حداقل چهار کلنی مشابه از نمونه تعیین هویت شده به یک لوله آزمایش دارای سرم فیزیولوژی استریل منتقل می‌شود.

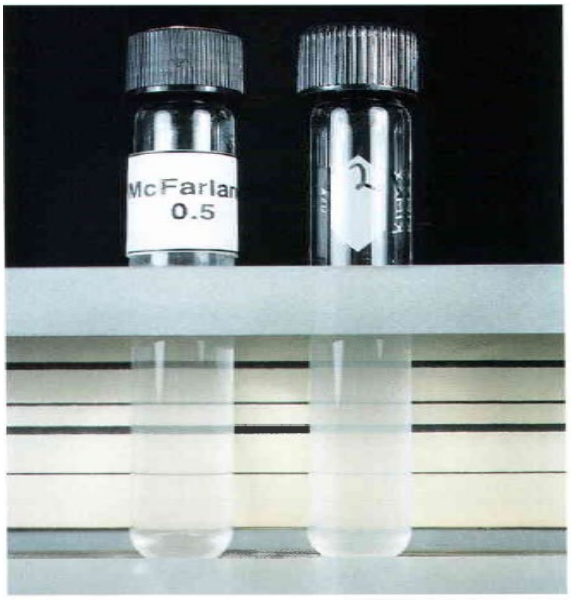
ب- تعیین تقریبی تعداد باکتری موجود در سوسپانسیون:

به دلیل اینکه به کار بردن تعداد کم و یا زیاد باکتری منجر به یافته‌های اشتباه خواهد شد، استفاده از تعداد مناسب باکتری مورد آزمایش بسیار مهم است. بنابراین باید پس از آماده سازی سوسپانسیون باکتری از روش کدورت سنجی استفاده کرده و تعداد تقریبی باکتری را در آن محلول مشخص نمود. این مرحله را در اصطلاح استاندارد نمودن تعداد باکتری می گویند. برای این منظور در آزمایشگاه‌ها از محلول استانـدارد نیم مک‌فارلند استفاده می‌شود (جدول ۱-۵ و شکل۱-۵). بدین ترتیب سوسپانسیون باکتری را با مایع نیم مک‌فارلند مقایسه نموده و اگر از نظر کدورت مشابه هم باشند ،به این معنا می‌باشد که در هر میلی لیتر از

سوسپانسیون تعداد۱/۵×۱۰۸ باکتری وجود دارد(۱/۵× ۱۰۸ CFU/ml). برای مقایسه کدورت این دو می‌توان از چشم غیر مسلح و یا از دستگاه‌های کدورت سنجی و یا اسپکتروفتومترنیز استفاده نمود.

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.175% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Approx. cell density (×10^8 CFU/ml)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
Absorbance in 600 nm	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

جدول۱-۵: سوسپانسیون مک‌فارلند ترکیبی حاوی کلرید باریم و اسید سولفوریک است که در نسبت‌های مختلف با هم ترکیب می شوند. ترکیب این دو با همدیگر منجر به تشکیل محلولی کدر می گردد. هر چه میزان کلرید باریم این مجموعه بیشتر باشد میزان کدورت بیشتر خواهد بود.

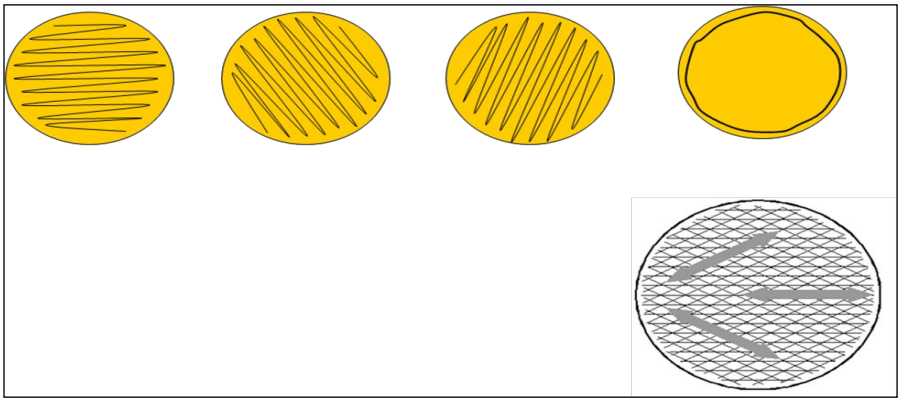


شکل۱-۵: مقایسه کدورت لوله حاوي سوسپانسیون باکتري با لوله نیم مك فارلند

ج- کشت سوسپانسیون روی محیط کشت مناسب:

برای انجام تست حساسیت میکربی ،عموما از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده می‌شود.در مورد باکتری‌های پرنیاز (Fastidious) می‌توان مواد افزودنی مانند خون به این محیط اضافه نمود. در مدت 15 دقیقه از زمان تنظیم کدورت، سوسپانسیون باید کشت داده شود. برای این کار سواب استریل را داخل لوله حاوی سوسپانسیون نموده، چند بار چرخانیده و بالاتر از سطح مایع به دیواره داخلی لوله فشار داده، تا مایع اضافی آن

گرفته شود. سواب در سطح مولر هینتون آگار کشت داده شودو باید ۲ بار دیگر(در مجموع ۳ بار) با چرخاندن پلیت، هر بار به میزان ۶۰ درجه، تکرارشود. به این ترتیب، از پخش یکنواخت سوسپانسیون بر سطح پلیت اطمینان حاصل می‌گردد. در پایان سواب باید حاشیه خارجی آگاررا نیزکشت دهد(شکل۲-۵).



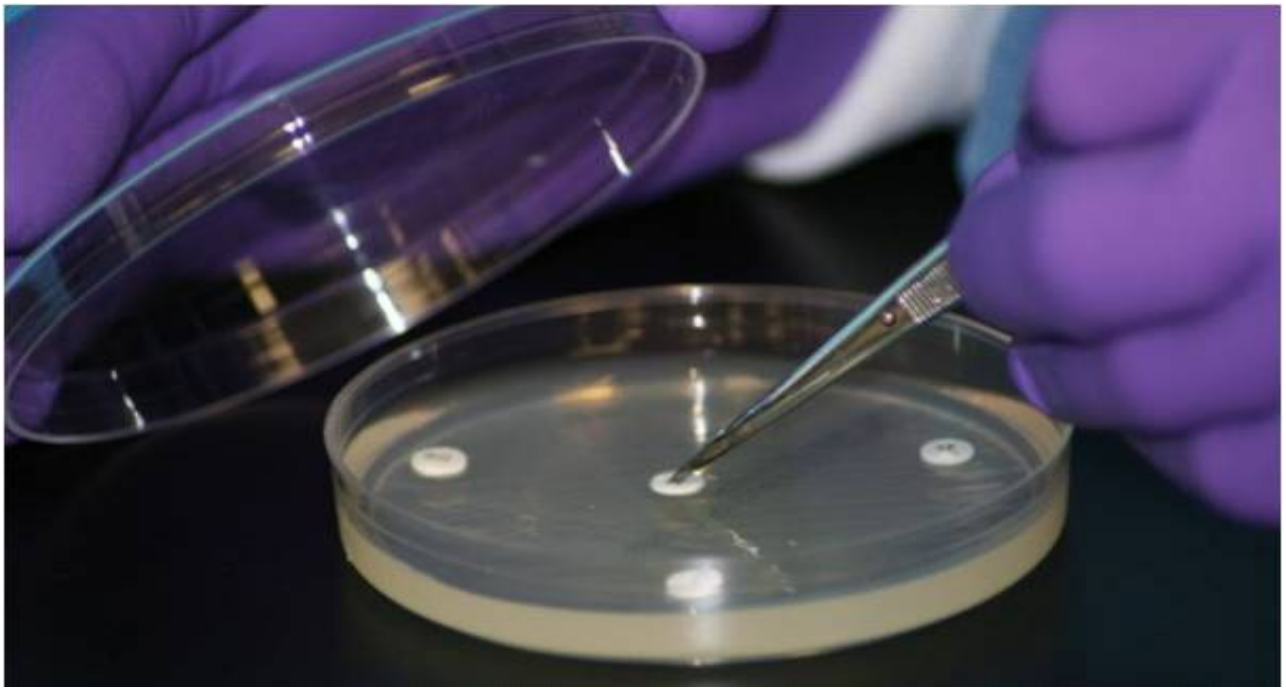
شکل ۲-۵: روش کشت جهت آنتی بیوگرام. از چپ به راست: سواب آغشته به باکتری را در جهت‌های مختلف روی سطح و در انتها حاشیه خارجی محیط مولر هینتون آگار بکشید. به صورتیکه باکتری در تمام سطح آن پخش شود.

د- دیسک گذاری:

حداکثر تا پانزده دقیقه پس از تلقیح باید دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی را بر روی سطح آن قرار داد. غلظت مناسب دارو برای هر دیسک قبلاً توسط CLSI تعیین شده و روی هر دیسک نوشته شده است. نام آنتی بیوتیک‌ها نیز به صورت اختصاری روی دیسک نوشته شده است (شکل ۳-۵). پس از کشت دادن باکتری دیسک‌های انتخاب شده در شرایط استریل و با استفاده از پنس به صورت کاملاً تخت بر روی سطح آگار قرار داده می‌شود (شکل 4-5). دیسک باید فقط یک بار با سطح آگار تماس یابد و از گذاشتن و برداشتن آنها خودداری کنید. پس از گذاردن همه دیسک‌ها آنها را با کمی فشار ثابت کنید که با وارونه کردن پلیت از سطح آگار جدا نشوند. فاصله هر دیسک ازدیسک دیگر نباید کمتر از ۲۴ میلی متر (مرکز به مرکز) باشد. دیسک‌ها از دیواره پلیت نیز باید ۱۵ میلی متر فاصله داشته باشند.

شکل ۳-۵: دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک. به حروف اختصاری آنتی بیوتیک و غلظت آن بر حسب میکرو گرم توجه کنید. E= اریترومایسین،

N= نئومایسین، AM= آمیکاسین و P= پنی سیلین



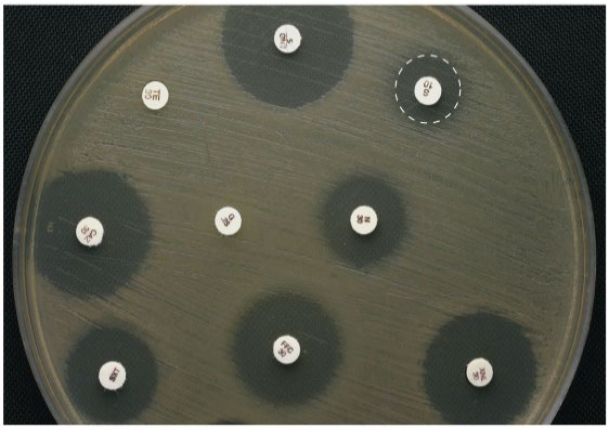
شکل ۴-۵: روش دیسک گذاری بر روی سطح آگار در شرایط استریل

ه- انکوباسیون:

پس از دیسک گذاری پلیت را نام گذاری نموده و آنرا در داخل انکوباتور قرار دهید. در مورد بسیاری از ارگانیسم‌ها انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و زمان ۱۸ ساعت انجام می‌گردد. مواردی نیز به عنوان استثناء وجود دارد که باید بر اساس قواعد استاندارد CLSI انکوبه گردند. روش انتشار دیسک برای ارگانیسم‌هائی که به زمان زیادی برای رشد نیاز دارند مناسب نمی‌باشد.

و- تفسیر نتایج:

پیش از خواندن نتیجه باید پلیت را از نظر رشد مناسب، هم گون و خالص بودن گونه باکتری بررسی کرد (کلنی‌ها باید یک شکل باشند). اگرهاله عدم رشد نامشخص و درهم باشد تکرار آزمایش لازم است. در صورت خالص بودن کشت و نیز مشخص بودن‌هاله عدم رشد باید مراحل اندازه گیری آن انجام گیرد (شکل ۵-۵). در مرحله اندازه گیری بدون باز کردن در پلیت و تنها از پشت پلیت و استفاده از خط کش (یا کولیس) قطرهاله عدم رشد اندازه گیری و بر اساس میلی متر ثبت می‌شود. به منظور تفسیر این نتایج از جداول استانداردی که توسط CLSI ارائه شده است، استفاده می‌گردد. با استفاده از این جداول و اندازه قطرهاله عدم رشد هر داروی ضدمیکربی ، باکتری در یکی از دسته‌های مقاوم، نیمه حساس و حساس قرار می‌گیرد (جدول2-5).



شکل ۵-۵: پلیت روش انتشار از دیسک پس از انکوباسیون. به خالص بودن باکتری و نیز قطرهاله عدم رشد دقت شود.

جدول ۲-۵: قطرهاله عدم رشد برای خانواده **استافیلوکوک**

Antibiotic		Resistant (R)	Intermediate (I)	Susceptible (S)
Ampicillin (10 µg)	AMP	≤28		≥29
Cefazolin (30 µg)	CZ, CFZ	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxone (30 µg)	CRO, CTR	≤13	14-20	≥21
Ciprofloxacin (5 µg)	CIP, CP	≤15	16-20	≥21
Clindamycin (2 µg)	CD, CC	≤14	15-20	≥21
Erythromycin (30 µg)	E, ERY	≤13	14-22	≥23
Gentamicin (10 µg)	GEM	≤12	13-14	≥15
Kanamycin (30 µg)	K	≤13	14-17	≥18

۲- روش رقت سازی متوالی

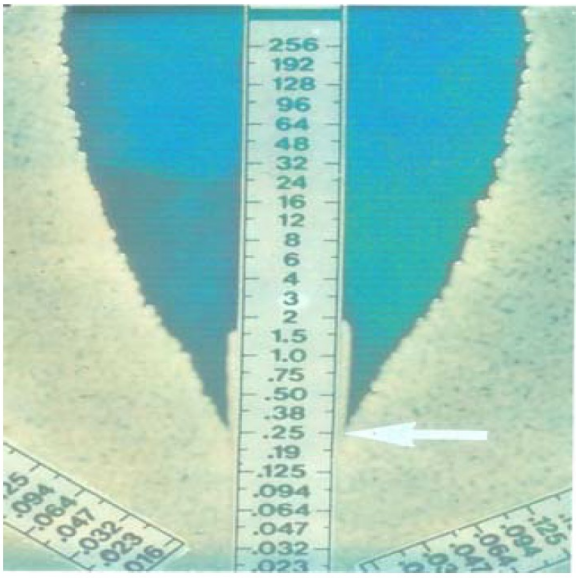
این روش بر اساس مواجهه باکتری جداشده با رقت‌های متوالی داروی ضدمیکربی می‌باشد. در این روش لوله آزمایشی که در آن باکتری رشد قابل مشاهده را ندارد (دارای کدورت نیست) دارای اهمیت است. غلظت آنتی بیوتیک در این لوله به عنوان کم ترین غلظت آنتی بیوتیک که از رشد قابل مشاهده باکتری در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌کند در نظر گرفته می‌شود. این غلظت به اصطلاح Minimum Inhibitory Concentration یا MIC نامیده می‌شود. این روش اطلاعاتی در مورد غلظت دقیق دارو در اختیار پزشک قرار می‌دهد و او را در انتخاب دقیق دارو و میزان مناسب آن راهنمایی می‌نماید.

رقت سازی متوالی می تواند با رقیق سازی آنتی بیوتیک در محیط کشت جامد (آگار) نیز انجام شود.

۳- روش انتشار گرادیانت

روش انتشار گرادیانت (E.test) ترکیبی از دو روش رقیق سازی و انتشار می‌باشد. در این روش غلظت‌های مختلف یک ماده ضدمیکربی روی یک نوار (به صورت شیب غلظتی) تلقیح شده است و مانند روش MIC بطور مستقیم حساسیت ضدمیکربی را به صورت کمی برای ما مشخص می‌کند.

روش دیسک دیفیوژن آگار که بر اساس انتشار است فقط حساس بودن یا نبودن به آنتی بیوتیک را مشخص می‌نماید در حالیکه در روش E.test علاوه بر مشخص شدن حساسیت یا مقاومت آنتی بیوتیکی به دلیل استفاده از غلظت‌های مختلف یک آنتی بیوتیک به صورت شیب غلظتی، میزان موثر آنتی بیوتیک را نیز نشان می‌دهد. در این روش پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی به روش نیم مک فارلند آن را روی پلیت مولر هینتون آگار منتقل نموده و سپس نوارهای E.test را که هر کدام معرف یک نوع آنتی بیوتیک بود بر روی آگار قرار داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه منطقه عدم رشدی بصورت مثلثی یا بیضی شکل ایجاد می‌شود (شکل۶-۵) ،سپس با مراجعه به جداول ارائه شده توسط CLSI حساس، نیمه حساس و یا مقاوم بودن نسبت به آنتی بیوتیک مذکور مشخص می‌گردد.



شکل۶-۵: ایجاد منطقه عدم رشد مثلثی یا بیضی شکل به علت افزایش آنتی بیوتیک. تقاطع بین محل‌هاله عدم رشد باکتری و نوار آنتی بیوتیک که با فلش سفید رنگ نشان داده شده است به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود

جلسه ششم: کشت ادرار

دستگاه ادراری به دو بخش مجرای ادراری فوقانی (کلیه‌ها، لگنچه کلیوی، میزنای) و مجرای ادراری تحتانی (مثانه و مجرای ادراری) تقسیم می‌شود.هریک از اجزاء این دستگاه می‌توانند دچار عفونت شوند.

میکربیوتای باکتریایی پرینه (Perineal) که عموماً منشاء آن‌ها لوله گوارشی است، باکتری‌های بیماری‌زای معمول دستگاه ادراری می‌باشند. خصوصاً آن دسته از این باکتری‌ها که دارای فاکتورهای اتصال به سلول‌های اپی تلیال ادراری هستند و اتصال را تسهیل می‌کنند.

فاکتورهایی احتمال عفونت ادراری را افزایش می‌دهند، برای مثال افرادی که طولانی مدت از کاتترهای ادراری استفاده می‌کنند ، احتمال بالاتری برای عفونت دستگاه ادراری دارند . باکتری‌ها می‌توانند طی ۵ روز در اجسام خارجی مانند کاتترهای ادراری کلنیزه شوند.همچنین آمیزش جنسی می‌تواند ورود باکتری‌ها به مجرای ادراری زنان را تسهیل کند و احتمال عفونت ادراری را افزایش دهد.

جمع آوری نمونه ادرار برای کشت:

به جز غشاء مخاطی مجرای ادرار که رشد میکربیوتا را حمایت می‌کند، دستگاه ادراری طبیعی، باکتری ندارد. ادرار به آسانی می‌تواند با باکتری‌های کانال واژینال، پرینه و یا میکربیوتای مجرای ادراری آلوده شود. جدول ۱-۶ فهرست میکربیوتایی که به عنوان آلودگی در ادرار محسوب می‌شوند و آن‌هایی را که بیماری‌زای بالقوه دستگاه ادراری هستند را نشان می‌دهد.

جدول ۱-۶: برخی ازباکتری‌های میکربیوتا وپاتوژن‌های بالقوه مجرای ادراری

Commensal Microbiota	Potential Pathogens
α/α-Hemolytic streptococci Bacillus spp. Coagulase-negative staphylococci Diphtheroids Lactobacillus spp.	Corynebacterium urealyticum[a] Enterococcus spp. Enterobacteriaceae[a] Pseudomonas spp. Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis (elderly men) Staphylococcus saprophyticus (young women)

[a]Proteae and Corynebacterium urealyticum are urea splitters, alkalinizing the urine and predisposing to stone formation.

الف-نمونه ادرار میانی (Midstream urine):

عموماً جهت کشت ادرار، نمونه ادرار میانی به روش Clean-catch جمع آوری می‌شود. جمع آوری ادرار میانی در خانم‌ها (به واسطه آناتومی دستگاه ادراری –تناسلی ، خانم‌ها ،مستعد آلودگی با ترشحات واژینال و پرینه می‌باشند) نیاز به آموزش دارد. ناحیه اطراف مجرای ادراری و پرینه با ۳-۲ گاز آغشته به آب و صابون از سمت جلو به عقب تمیز می‌گردد. سپس توسط آب یا سرم نمکی استریل شستشو داده می‌شود. چند میلی لیتر اولیه ادرار جهت پاک کردن مجرای ادراری از باکتری‌ها ،دور ریخته می‌شود.

بخش میانی ادرار در یک ظرف دهانه گشاد استریل جمع آوری شده و درب آن کاملا بسته شود. جهت جلوگیری از تکثیر میکربیوتا، توصیه می‌شود نمونه ادرار جهت انتقال در لوله‌های انتقال که حاوی یک نگهدارنده هستند حمل شوند و یا سریعا کشت داده شوند.

جمع آوری ادرار آقایان: نیاز به پاک کردن توسط آب صابون نمی‌باشد. ترجیحاً تمیز کردن ساده محل خروج ادرار قبل از جمع آوری کفایت می‌کند. سپس ادرار میانی در ظرف استریل جمع آوری می‌گردد.

معمولاً این دستورات به صورت یک کارت یا تایپ شده در محل جمع آوری ادرار باید وجود داشته باشد، برای بیمارانی که نمی‌توانند بخوانند ، باید یک نیروی کمکی یا پرستار نکات را به آن‌ها آموزش دهد.

دقت جمع آوری نمونه ادرار توسط تعداد کلنی‌هایی که روی محیط کشت رشد می‌کنند کنترل می‌شوند.

در نمونه ادرار افرادی که عفونت ادراری ندارند معمولاً هیچ باکتری یا $۱۰^{۲}$ – $۱۰^{۴}$ باکتری در هر میلی لیتر (CFU/ML) از ادرار رشد می‌کنند، در حالی که در نمونه‌های عفونی تعداد باکتری‌ها در هر میلی لیتر (CFU/ML) $۱۰^{۵}$ باکتری یا بیشتر می‌باشد.

نمونه‌های ادرار حداکثر باید طی ۲ ساعت پس از جمع آوری، کشت داده شوند، تا بتوان به تعداد دقیق کلنی‌ها دست یافت. اگر زمان بیشتری برای انتقال نیاز می‌باشد باید از مواد نگهدارنده استفاده کرد.

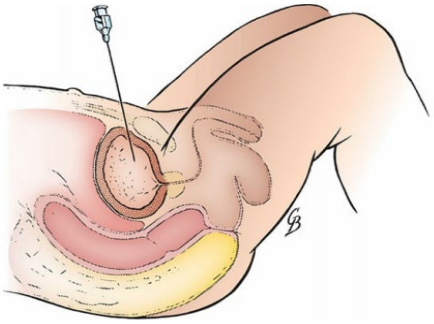
ب -جمع آوری نمونه ادرار از کاتتر (Catheter Collection):

جمع آوری نمونه از کاتتر محدود به بیمارانی می‌شود که قادر به جمع آوری ادرار به روش Clean-catch نیستند. تا حد امکان نباید از کاتتر، ادرار جمع آوری کرد ،.چون احتمال ورود باکتری‌های بیماری‌زا را بالا می برد.

در صورت لزوم نمونه گیری از کاتتر ادراری ،حتماً باید شرایط آسپتیک در نظر گرفته شود و چند میلی لیتر ابتدای ادرار کاتتر باید دور ریخته شود. همچنین نمونه، نباید از کیسه ادرار گرفته شود. در کودکان جمع آوری ادرار توسط کیسه ادراری رایج می‌باشد. در هر صورت تفسیر نتایج نمونه‌های به دست آمده از کیسه‌های ادراری مشکلات خاص خود را دارد.

ج – جمع آوری نمونه ادرار از مثانه(Supra pubic Aspiration):

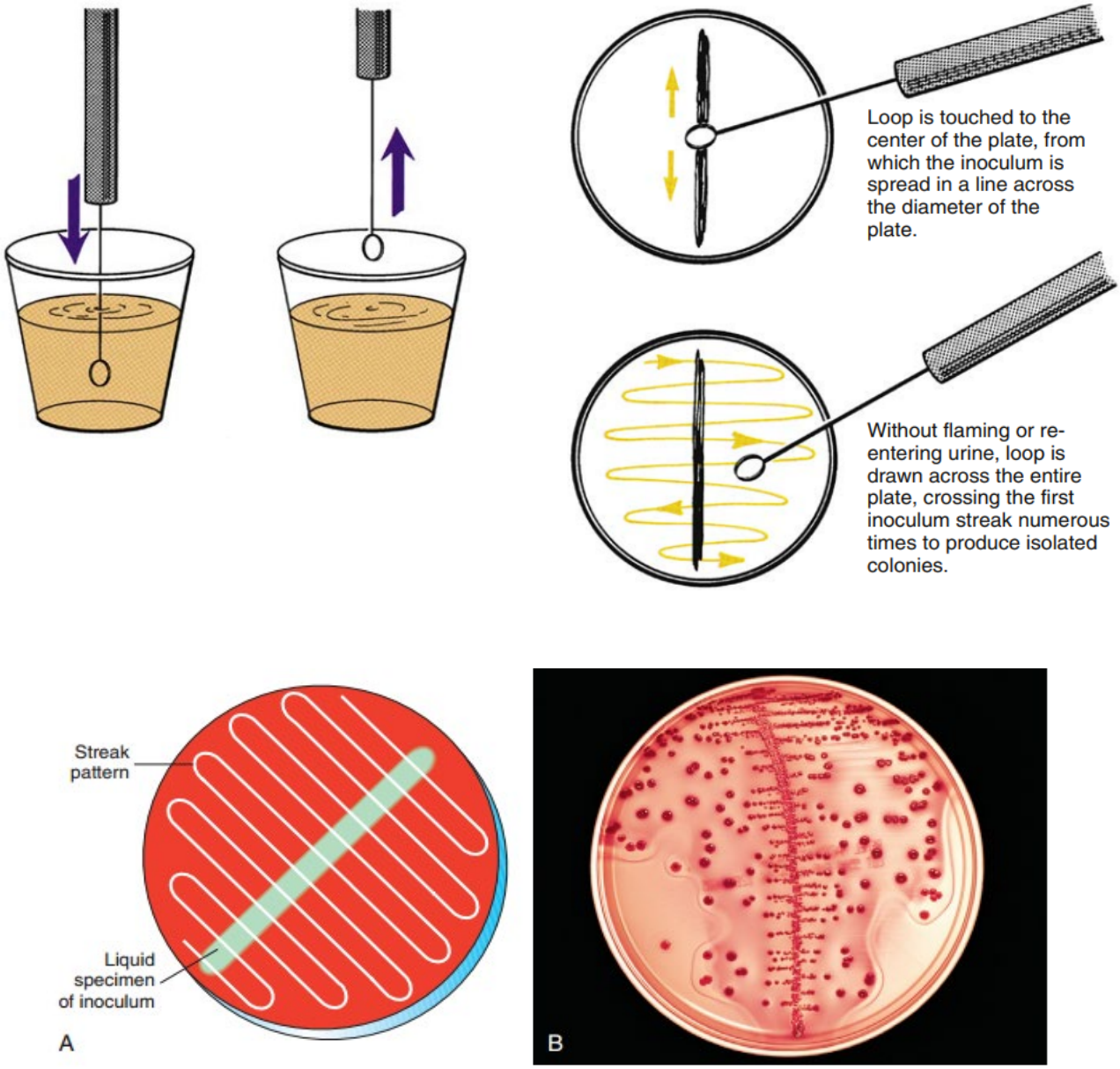
معمولا این نوع نمونه گیری بیشتر برای نوزادان و بچه‌های کوچک استفاده می‌شود (شکل۱-۶) .در این روش باید مثانه پر باشد. پس از ضدعفونی کردن پوست در ناحیه مثانه، با تزریق زیر جلدی ماده بی حسی، ناحیه آماده ورود سرنگ آسپیراسیون ادرار می‌شود. با سرنگ مخصوص ۱۰ میلی لیتر از ادرار مثانه آسپیره می‌شود. این نوع نمونه گیری به علت این که روشی تهاجمی است، بندرت استفاده می‌شود.



(شکل۱-۶): جمع آوری نمونه ادرار از مثانه

کشت نمونه‌های ادراری:

برای کشت اولیه نمونه ادرار، هم محیط‌های انتخابی و هم غیر انتخابی مورد نیاز می‌باشد. معمولاً یک پلیت مک کانکی آگار و یک پلیت بلادآگار با ۵ درصد خون گوسفند کفایت می‌کند. توسط یک لوپ کالیبر شده ۰/۰۱ میلی لیتر از ادرار را برداشت نموده، در روی محیط‌های کشت تلقیح نموده و به روشی که در شکل (۶-۲)نشان داده شده است ، کشت داده می‌شود.



شکل ۲-۶ :روش کشت ادرار

در برخی آزمایشگاه‌ها برای این که شمارش کلنی‌ها دقیق تر باشد ، هم زمان ml ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ از ادرار در پلیت‌های مجزا کشت داده می‌شود. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۵-۳۷ گرماگذاری می‌شوند.تعدادکلنی های رشد کرده، شمارش شده و با توجه به حجم لوپ استفاده شده،تعداد کلنی ها در یک میلی لیتر(cfu,Colony forming unit)از ادرار گزارش می شود.

معمولا اگر تعداد باکتری رشد کرده در پلیت ، 10^{5} باکتری در هر میلی لیتر(Colony Forming Unit) یا بیشتر محاسبه شود،به عنوان عفونت در نظر گرفته شده، شاسایی و بررسی حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها انجام می‌شود.

هنگامی که شمارش کلنی‌ها بین CFU/ML(Colony Forming Unit) 10^5 – 10^4 می‌باشد یا انواع مختلفی باکتری از یک نمونه ادرار رشد کرده است، مسئول آزمایشگاه باید جهت شناسایی باکتری‌ها و حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها تصمیم گیری نماید. کشت‌های نمونه‌های کاتتر و سوپراپوبیک با هر تعداد باکتری به دقت پیگیری و بررسی می‌شوند. همچنین CFU/ML 10^2 از باسیل‌های گرم منفی روده ای در خانم‌های دارای علامت سندرم ادراری حاد، می‌تواند حائز اهمیت باشد. در هر صورت بررسی آلودگی نمونه ادرار در شمارش‌های پایین کشت ادرار باید در نظر گرفته شود.

مشاهده میکروسکوپی نمونه ادرار سانتریفیوژ نشده، می‌تواند به تفسیر نتایج کشت کمک کند، به طوری که اگر در هر صفحه میکروسکوپی یک باکتری دیده شود، حداقل شمارش حدود CFU/ML 10^5 خواهد بود.

همچنین از نوارهای ادراری که می‌توانند حضور نیتریت در ادرار را نشان دهند (نشانه عفونت با انتروباکترالز(Entrobacterales)) استفاده نمود. البته نتایج مثبت کاذب در این روش مشاهده می‌شود ، که باید در نظر گرفته شود.

آزمایش غربالگری برای پیوریا (Pyuria)

پیوریا ، به معنای حضور گلبول‌های سفید در ادرار می‌باشد،که یکی از علت‌های آن ،عفونت باکتریایی ادرار می‌باشد.

آزمایش LE (لوکوسیت استراز) که توسط لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلئر تولید می‌شود، می‌تواند توسط یک نوار ادراری بررسی شود. این آزمایش جهت بررسی روند التهابی انجام می‌شود .نتایج مثبت کاذب در مواردی که ادرار حاوی مقادیر زیادی اسید اسکوربیک، آلبومین، پاک کننده‌ها و یا نگهدارنده باشند، مشاهده شود.

موارد منفی کاذب نیز، زمانی که تعداد نوتروفیل‌ها بین(**High Power Field**) HPF/۱۰- ۵ است، مشاهده می‌شود.

در هر صورت آزمایش LE بهتر از شمارش نوتروفیل‌ها می‌تواند پیوریا را مشخص کند، خصوصاً وقتی فاصله بین نمونه گیری ادرار و آزمایش زیاد باشد.

جلسه هفتم : باسیل‌ها و کوکوباسیل‌های گرم منفی

دستور کار:

تفسیر کشت ادرار

تهیه گسترش و رنگ آمیزی گرم از کلنی‌های کشت ادرار

انجام آزمایش کاتالاز و اکسیداز

کشت باسیل گرم منفی روی محیط مکانکی آگار .

کشت نقطه‌ای کلنی باسیل گرم منفی در محیط نوترینت آگار

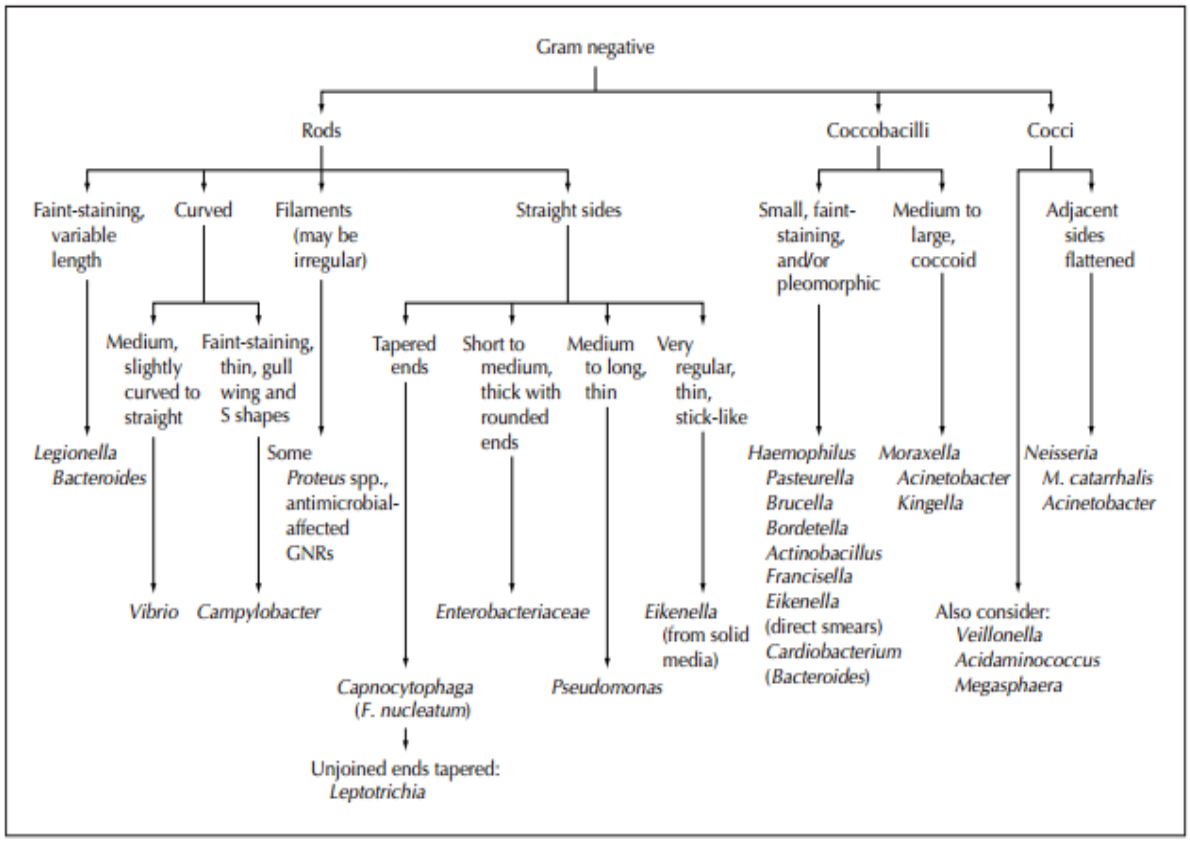
کشت کلنی باسیل گرم منفی در محیط کلیگلر آیرون آگار

کشت کلنی باسیل گرم منفی در محیط SIM

کشت کلنی باسیل گرم منفی در محیط MR-VP**(دو لوله)**

کشت کلنی باسیل گرم منفی در محیط سیمون سیترات آگار

کشت کلنی باسیل گرم منفی در محیط اوره



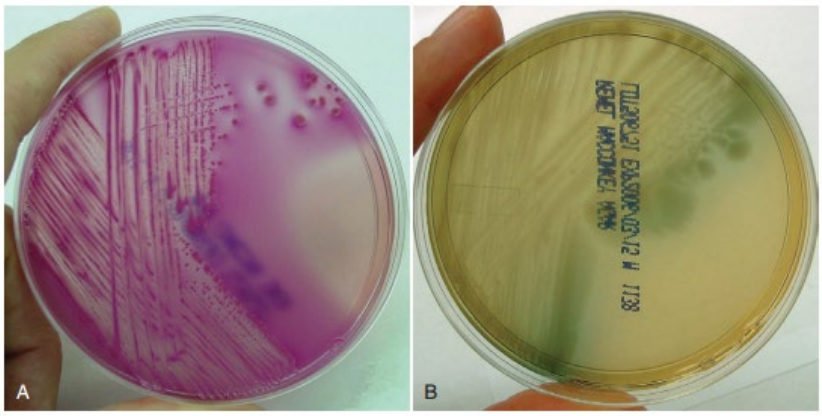
نمودار ۱-۷ :تقسیم بندی باکتری‌های گرم منفی براساس شکل آن‌ها در رنگ آمیزی گرم

باسیل‌ها و کوکوباسیل‌های گرم منفی، دسته بزرگی از باکتری‌ها را شامل می‌شوند، که می‌توانند به اشکال متفاوتی مشاهده شوند: باسیل‌هایی با رنگ پذیری ضعیف و اندازه متغیر، باسیل‌های خمیده، باسیل‌های معمولی (صاف و کشیده) و یا کوکوباسیل‌ها(نمودار ۱-۷). باکتری‌های این دسته با استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی در خانواده‌های متفاوت طبقه بندی می‌شوند.

در این بخش به شناسایی دو گروه بزرگ از این باکتری‌ها یعنی راسته انتروباکترالز(Entrobacterales) و باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری می‌پردازیم. راسته انتروباکترالز شامل ۷ خانواده:

Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Hafniaceae, Morganellaceae and Budvicaceae

کشت در محیط مک کانکی آگار (Maccankey Agar)



شکل ۱-۷: کشت در محیط مک کانکی آگار

هدف :

هدف از این کشت جداسازی باکتری‌های گرم منفی و افتراق راسته انتروباکترالز می‌باشد.

پایه و اساس :

یک محیط انتخابی و افتراقی برای باسیل‌های گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری می‌باشد. این محیط حاوی پروتئین ، نمک‌های صفراوی، کلرورسدیم، لاکتوز، معرف قرمز خنثی ، رنگ کریستال ویوله و آگار است.انتخابی بودن محیط به علت وجود نمک‌های صفراوی و کریستال ویوله می‌باشد که از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و اجازه رشد به باسیل‌های گرم منفی می‌دهد.

افتراقی بودن محیط به علت وجود قند لاکتوز می‌باشد . انواعی که قادرند لاکتوز را تخمیر نمایند، به علت ایجاد اسید و تغییر رنگ معرف محیط کشت ،کلنی‌های صورتی یا قرمز تولید کرده و از انواعی که لاکتوز را تخمیر نمی‌کنند و کلنی‌های بی رنگ دارند متمایز می‌شوند (شکل ۱-۷) .

روش :

مقداری از نمونه بالینی یا کلنی باکتری را در سطح محیط ، کشت داده و در دمای ۳۵-۳۷°C به مدت۲۴-۱۸ ساعت گرماگذاری شود.

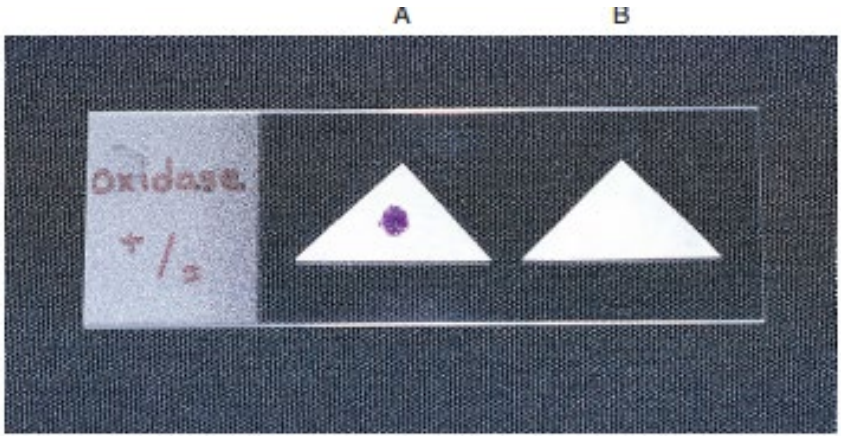
نتیجه :

مشاهده کلنی در سطح محیط کشت ،توانایی رشد باکتری در این محیط را نشان می‌دهد.

توانایی تخمیر لاکتوز با تشکیل کلنی به رنگ صورتی یا قرمز مشخص می‌شود(شکل ۱ -۷).

عدم توانایی تخمیر لاکتوز با تشکیل کلنی بی رنگ مشخص می‌شود(شکل ۱-۷).

آزمایش اکسیداز :



شکل۲-۷ : آزمایش اکسیداز،رنگ ارغوانی تصویر سمت چپ نتیجه مثبت را نشان می‌دهد.

هدف:

تعیین حضور سیتوکروم اکسیداز، جهت شناسایی راسته انتروباکترالز (Entrobacterales) (اکسیداز منفی) از سایر باسیل‌های گرم منفی.

پایه و اساس:

در صورت حضور سیتوکروم اکسیداز، ماده تترامتیل- پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید (Tetramethyl-P-phenylene diamine dihydrochloride) اکسید شده و تبدیل به ماده اندوفنل (ارغوانی تیره) می‌شود. در صورت عدم حضور اکسیداز تغییر رنگی وجود ندارد.

روش :

با استفاده از یک سواب چوبی یا پلاتینی مقداری از کلنی باکتری بر روی دیسک کاغذی (حاوی۱ ٪ تترامتیل پارافنیلن دی آمین هیدروکلراید) گذاشته شود. بررسی تغییر رنگ در محل تلقیح کلنی در ۱۰ ثانیه بررسی گردد.

نتیجه :

مثبت: ایجاد رنگ ارغوانی تیره در محل تلقیح کلنی (شکل۲-۷)

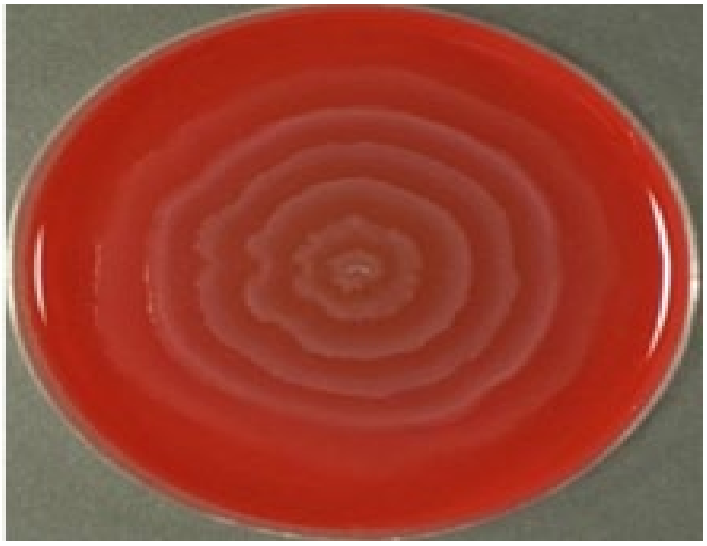
منفی: عدم تغییر رنگ در محل تلقیح کلنی (شکل۲-۷)

محدودیت‌ها :

استفاده از وسیله برداشت کلنی با جنس کروم یا آهن سبب ایجاد نتیجه ی مثبت کاذب آزمایش می‌شود.

پدیده سوارمینگ (Swarming pHenomenon):

پدیده سوارمینگ که در برخی از باکتری‌ها مشاهده می‌شود ،نتیجه تولید یک لایه نازک از رشد باکتری متحرک بر روی محیط آگار می‌باشد که به صورت امواجی در محیط گسترده می‌شود. مرکز این امواج محل تلقیح اولیه باکتری می‌باشد(شکل۳-۷).



شکل۳-۷: پدیده سوارمینگ در محیط کشت

هدف:

بررسی پدیده سوارمینگ .

پایه واساس آزمایش:

یکی از پدیده‌هایی که به تشخیص جنس پروتئوس کمک شایان توجهی می نماید کشت نقطه ای پروتئوس در سطح پلیت حاوی ژلوز ساده یا بلاد آگار است که با تشکیل پرده ای مواج (پدیده سوارمینگ) خود را نمایان می سازد (شکل۳-۷) .

روش کار:

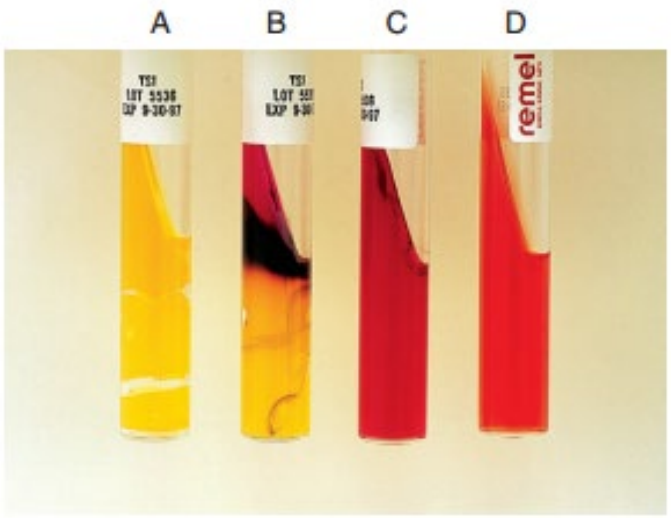
با استفاده ازلوپ از باکتری برداشت نموده وبه صورت نقطه ای در پلیت کشت داده و در دمای ۳۷-۳۵°C به مدت۲۴-۱۸ ساعت گرماگذاری می‌شود.

نتیجه:

مشاهده حرکت موجی در محیط کشت آگار نتیجه مثبت محسوب می‌شود (شکل۳-۷).

کشت در محیط کلیگلرآیرون آگار(KIA):

این آزمایش جهت افتراق اعضای راسته انتروباکترالز (Entrobacterales)از سایر باسیل‌های گرم منفی استفاده می‌شود.



شکل۴-۷: کشت در محیط کلیگلر آیرون آگار

A: اسید/اسید،گاز مثبت، **H_2S** منفی

B : قلیا/اسید،گاز مثبت، **H_2S** مثبت

C : قلیا/قلیا،گاز منفی، **H_2S** منفی

D : محیط بدون کشت باکتری

هدف:

این محیط جهت بررسی تخمیر گلوکز، لاکتوز، تولید گاز (CO_2) وتولید H_2S استفاده می‌شود.

پایه و اساس:

ترکیب محیط شامل لاکتوز به میزان ۱۰ برابر گلوکز، پیتون، فنل رد (معرف تخمیر قندها) فریک آمونیوم سیترات و سدیم تیوسولفات می‌باشد.

در ۸-۱۲ ساعت پس از کشت باکتری در این محیط، در صورت تخمیر گلوکز، اسید حاصل شده و معرف فنل رد از رنگ قرمز به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد. رنگ زرد حاصل در عمق لوله باقی می ماند، به این علت که در عمق محیط کشت شرایط بی‌هوازی (Anaerobic) جهت تخمیر مهیا می‌باشد(شکل BوA ۴ -۷).

رنگ زرد در بخش شیب دار محیط به علت متابولیسم اکسیداتیو پپتون‌ها در محیط و تبدیل شدن به آمین‌های قلیایی ،از بین رفته و به رنگ قرمز در می آید.

اگر باکتری علاوه بر گلوکز بتواند لاکتوز را تخمیر نماید، مقادیر زیاد محصولات تخمیری(اسید)، رنگ زرد را در بخش شیب دار خواهیم داشت(شکل ۴A -۷). نتایج محیط کشت طی ۲۴-۱۸ ساعت باید بررسی شوند.

تشکیل CO_2 به صورت حباب‌ها یا شکاف‌هایی در محیط کشت مشخص می‌شود(شکل ۴A -۷). تشکیل H_2S نیز به صورت رنگ سیاه در محیط مشخص می‌شود. وقتیH_2S تولید می‌شود با فریک آمونیوم سیترات واکنش داده و تولید ترکیب سولفید آهن سیاه رنگ می‌شود(شکلB ۴ -۷). این واکنش نیازمند شرایط اسیدی می‌باشد، پس حتماً در این بخش از محیط تخمیر صورت گرفته است.

روش :

به وسیله یک نیدل (Needle)از یک کلنی خالص برداشت شده و ابتدا از حد فاصل قسمت عمقی و سطحی محیط کشت، به صورت عمقی وارد محیط کشت شده و قبل از رسیدن به عمق لوله، نیدل را خارج کرده و در سطح شیب دار به صورت مارپیچی کشت داده می‌شود (شکل ۵-۳) .در محیط کشت را بسته در دمای $37^{\circ}C$-۳۵، به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرماگذاری می‌کنیم.

نتیجه :

سطح قلیایی و عمق بدون تغییر رنگ نشان دهنده عدم استفاده از قند توسط باکتری می‌باشد، به صورت K/K (Alkaline/ Alkaline) گزارش می‌شود. (شکلC ۴-۷) .

سطح قلیایی و عمق اسیدی نشان دهنده تخمیر گلوکز و عدم تخمیر لاکتوز می‌باشد و به صورت (Alkaline/ Acid) K/A گزارش می‌شود(شکلB ۴ -۷).

سطح اسیدی و عمق اسیدی نشان دهنده تخمیر گلوکز و لاکتوز می‌باشد و به صورت A/A گزارش می‌شود(شکل ۴A -۷).

ایجاد حباب یا شکاف معرف تولید CO_2 می‌باشد(شکل ۴A -۷).

مشاهده رنگ سیاه در عمق محیط کشت معرف تولید H_2S می‌باشد. (شکلB ۴ -۷).

کشت در محیط SIM:

یک محیط نیمه جامد می‌باشد که برای آزمایشات زیر استفاده می‌شود.

آزمایش اندل:

هدف:

این آزمایش جهت تعیین توانایی تولید آنزیم تریپتوفاناز توسط باکتری استفاده می‌شود.

پایه و اساس:

در این آزمایش تبدیل تریپتوفان موجود درمحیط کشت به ترکیب اندل بررسی می‌شود. تریپتوفان توسط آنزیم تریپتوفاناز هیدرولیز شده و تولید پیرووات، آمونیاک و اندل می‌نماید. معرف کواکس (Dimethylamine-benzaldehyde – hydrochloride) می‌تواند با ترکیب اندل واکنش داده و ایجاد رنگ قرمز می‌نماید.

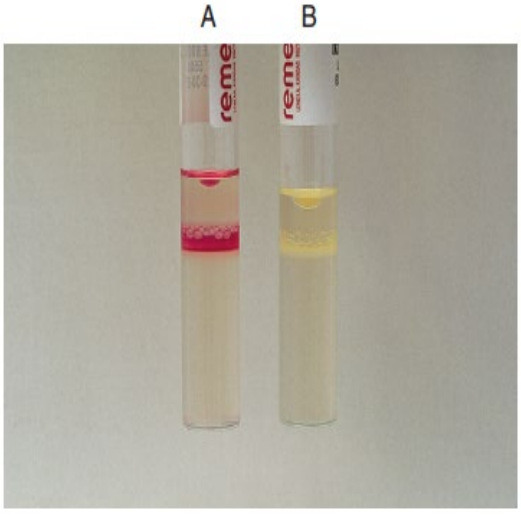
روش:

توسط نیدل از کلنی خالص باکتری برداشت نموده و در راستای یک خط راست درمحیط SIM کشت داده می‌شود (کشت یکبار انجام می‌شود و نیدل تا انتهای محیط وارد نمی‌شود). در دمای ۳۷°C- ۳۵، به مدت ۲۴-۱۸ ساعت گرماگذاری شده و سپس با افزودن ۲-۱ قطره معرف کواکس به محیط کشت ، تولید اندل بررسی می‌شود(شکل۵-۷).

نتیجه

مثبت: ایجاد رنگ صورتی یا قرمز (با افزودن معرف کواکس) (شکلA ۵-۷)

منفی: عدم تغییر رنگ محیط با افزودن معرف کواکس (شکلB۵-۷)

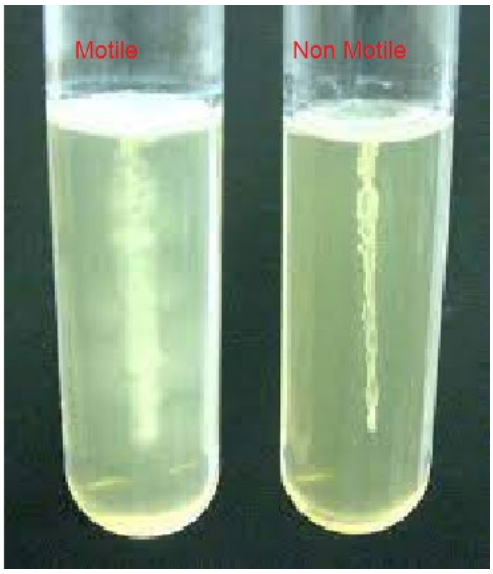


شکل۵-۷: محیط **SIM**

آزمایش حرکت:

هدف :

هدف از این آزمایش بررسی متحرک بودن باکتری می‌باشد.



شکل ۶-۷: کشت در محیط نیمه جامد و بررسی حرکت

پایه و اساس :

باکتری در مرکز محیط کشت نیمه جامد به صورت یک خط ، تلقیح می‌شود. باکتری که متحرک می‌باشد، از خط کشت به سمت خارج نفوذ می‌کند و در اطراف خط کشت ویا تمام محیط کدورت ایجاد می‌نماید.

روش :

توسط نیدل از کلنی خالص باکتری برداشت نموده و در راستای یک خط راست درمحیط SIM کشت داده می‌شود (کشت یکبار انجام می‌شود و نیدل تا انتهای محیط وارد نمی‌شود). در دمای $37^{\circ}C$ -۳۵، به مدت ۱۸-۲۴ ساعت گرماگذاری شده و اگر رشد باکتری قابل مشاهده نباشد ،به مدت ۷ روز گرماگذاری شده و روزانه بررسی می‌شود.

نتیجه :

مثبت: رشد باکتری فراتر از خط کشت (شکل ۶-۷)

منفی: باکتری غیرمتحرک در خط کشت رشد کرده و باقی می ماند. (شکل ۶-۷)

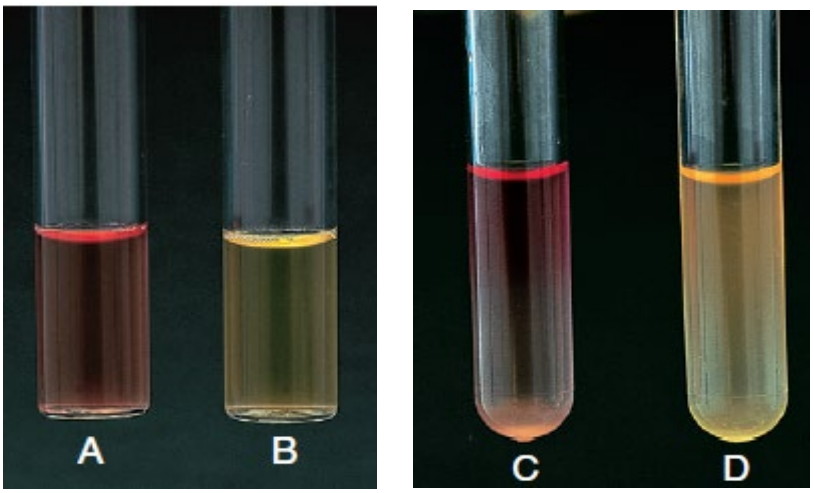
محدودیت‌ها:

برخی از باکتری‌ها رشد کافی را نشان نمی‌دهند، به همین جهت به آزمایشات تکمیلی برای بررسی حرکت، نیاز می‌باشد.

نکته:

در محیط SIM همچنین تشکیل رنگ سیاه، نشان دهنده تولید H_2S توسط باکتری می‌باشد.

آزمایش MR_VP:



شکل ۷-۷: محیط **MR_VP**.

A : **MR** مثبت، **B**: **MR** منفی، **C**: **VP** مثبت ، **D**: **VP** منفی

هدف :

هدف از آزمایش Voges Proskauer(VP _(Methyl Red (MR افتراق اعضاء راسته انتروباکترالز(Entrobacterales) می‌باشد.

پایه و اساس:

این آزمایش جهت تعیین توانایی باکتری برای تولید محصولات خنثی از تخمیر گلوکز (مانند استوئین) ،تولیداسید از گلوکزو بقاء باکتری در این شرایط استفاده می‌شود.

آزمایش متیل رد، تولید اسید مخلوط را در نتیجه تخمیر بررسی می‌کند، که سبب کاهش pH (اسیدیته) محیط می‌شود. معرف متیل رد در۴/۴= pH ، به رنگ قرمز و در۶/۲=pH به رنگ زرد می‌باشد.

در نتیجه رنگ زرد، واکنش منفی و رنگ قرمز نشان دهنده واکنش مثبت است (شکل B **و** A **۷-۷**).

طیف رنگ نارنجی، نشان دهنده واکنش منفی است.

آزمایش VP، تبدیل محصولات اسیدی را به استوئین و ۲-۳ بوتاندیول تعیین می‌کند. باکتری‌هایی که از مسیر VP استفاده می‌کنند، مقادیر ناچیزی اسید از تخمیر گلوکز فراهم می‌نمایند که قادر نیست با معرف MR، رنگ قرمز ایجاد کند. یک معرف به نام آلفا نفتل(AlpHa- napHtol)و متعاقب آن هیدروکسید پتاسیم، جهت بررسی مسیر VP استفاده می‌شود،این ترکیبات بااستوئین رنگ قرمز ایجاد می‌نمایند(نتیجه مثبت) (شکل C **۷-۷**).

روش:

توسط لوپ از یک کلنی خالص باکتری (کشت ۲۴ ساعته) به دو لوله از محیط MR-VP تلقیح شده ودر دمای ۳۵-۳۷ °C حداقل به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شود. اگر نتایج کشت ۴۸ ساعته واضح نبود، کشت مجدد در محیط و گرماگذاری به مدت ۴-۵ روز توصیه می‌شود. همچنین می‌توان همزمان کشت در ۲۵°C نیز انجام شود.

جهت آزمایش MR، ۵-۶ قطره معرف MR به ازای ۵ میلی لیتر از محیط اضافه شود و فوراً نتیجه خوانده شود.

برای آزمایش VP، به ازاء هر ۱ میلی لیتر از محیط کشت ابتدا ۶ قطره معرف آلفانفتل وسپس ۲ قطره هیدروکسید پتاسیم اضافه شود، محیط و معرف کاملاً مخلوط گردند و نتیجه تا ۵ دقیقه خوانده شود.

نتیجه:

آزمایش MR:

مثبت: حضوررنگ قرمز پس از افزودن معرف (**شکل**A **۷-۷**).

منفی: رنگ زرد پس از افزودن معرف (**شکل** B **۷-۷**).

نکته: طیف رنگ نارنجی نشانگر نتیجه منفی می‌باشد ولی نارنجی متمایل به قرمز می‌تواند نشان دهنده نتیجه مثبت ضعیف باشد.

آزمایش VP :

مثبت: حضور رنگ قرمز پس از افزودن معرف (**شکل**C **۷-۷**).

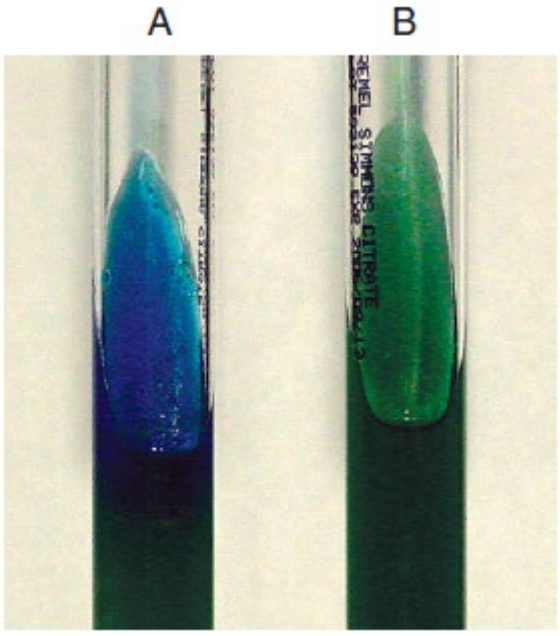
منفی: رنگ زرد پس از افزودن معرف نشان دهنده نتیجه منفی می‌باشد(**شکل**D **۷-۷**).

محدودیت‌ها:

آزمایش MR نباید قبل از ۴۸ ساعت گرماگذاری خوانده شود. چون ممکن است اسید به اندازه کافی تولید نشده باشد و یا باکتری‌های MR منفی فرصت کافی برای تبدیل محصولات اولیه به استوئین نداشته باشند و مثبت کاذب شوند.

نتایج آزمایش MR- VP باید همراه با آزمایشات دیگر برای افتراق اعضا راسته انتروباکترالز(Entrobacterales) استفاده شود.

آزمایش مصرف سیترات:



شکل ۸-۷: آزمایش سیترات

هدف:

هدف از این آزمایش بررسی توانایی باکتری در استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن و استفاده از نمک‌های آمونیوم به عنوان تنها منبع نیتروژن می‌باشد. از این آزمایش جهت افتراق انتروباکترالز(Entrobacterales) از سایر باکتری‌های گرم منفی استفاده می شود.

پایه و اساس :

باکتری‌هایی که قادرند روی این محیط رشد کنند، آنزیمی به نام سیترات پرمه آز تولید می‌کنند که سیترات را به پیرووات تبدیل می‌کنند. پیرووات وارد چرخه متابولیسم باکتری شده و انرژی تولید می‌کند.

باکتری‌هایی که قادرند در این محیط رشد و سیترات را مصرف کنند و همچنین قادرند فسفات آمونیوم را به آمونیاک و هیدروکسید آمونیوم تبدیل نمایند، سبب قلیایی شدن محیط کشت می‌شوند. در این pH معرف برم تیمول بلو موجوددر محیط کشت از رنگ سبز، به رنگ آبی تغییر رنگ می‌دهد(شکلA ۸-۷).

روش :

توسط لوپ کمی از کلنی خالص باکتری (کشت ۲۴ ساعته) برداشت و بر روی محیط سیمون سیترات آگار کشت داده شود. در دمای ۳۵-۳۷ °C به مدت ۷ روز گرماگذاری شودو روزانه محیط کشت، جهت رشد و تغییر رنگ بررسی شود.

نتیجه :

مثبت: رشد روی محیط کشت با تغییر رنگ و بدون تغییر رنگ (شکلA ۸-۷).

منفی: عدم رشد در روی محیط کشت (شکلB ۸-۷).

محدودیت‌ها:

برخی باکتری‌ها قادر به رشد روی محیط کشت هستند، ولی تغییر رنگ ایجاد نمی‌کنند. در این موارد رشد باکتری به عنوان نتیجه مثبت تلقی می‌شود.

آزمایش اوره آز:

شکل ۹-۷ :آزمایش اوره آز

A: مثبت **B**: منفی

هدف:

این آزمایش جهت تعیین تولید آنزیم اوره‌آز توسط باکتری استفاده می‌شود.

پایه و اساس:

اوره محصول دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه می‌باشد.

هیدرولیز اوره سبب تولید CO_2 و آمونیاک می‌شود. آمونیاک سبب قلیایی شدن محیط کشت می‌شود. معرف فنل رد می‌تواند این تغییر pH را نشان دهد. فنل رد در pH=6.8 به رنگ نارنجی روشن در pH=8.1 به رنگ صورتی می‌باشد. باکتری که قادر به تولید آنزیم اوره‌آز باشد ،سبب تغییر رنگ محیط اوره به رنگ صورتی در مدت ۲۴ ساعت می‌شود(شکل۹-۷).

روش:

توسط فیلدو پلاتین از کلنی خالص باکتری (کشت ۲۴ ساعته) برداشت و به محیط اوره تلقیح می‌شود. درپوش محیط کشت را بسته و در دمای ۳۵-۳۷ $^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت الی ۷ روز گرماگذاری شود.

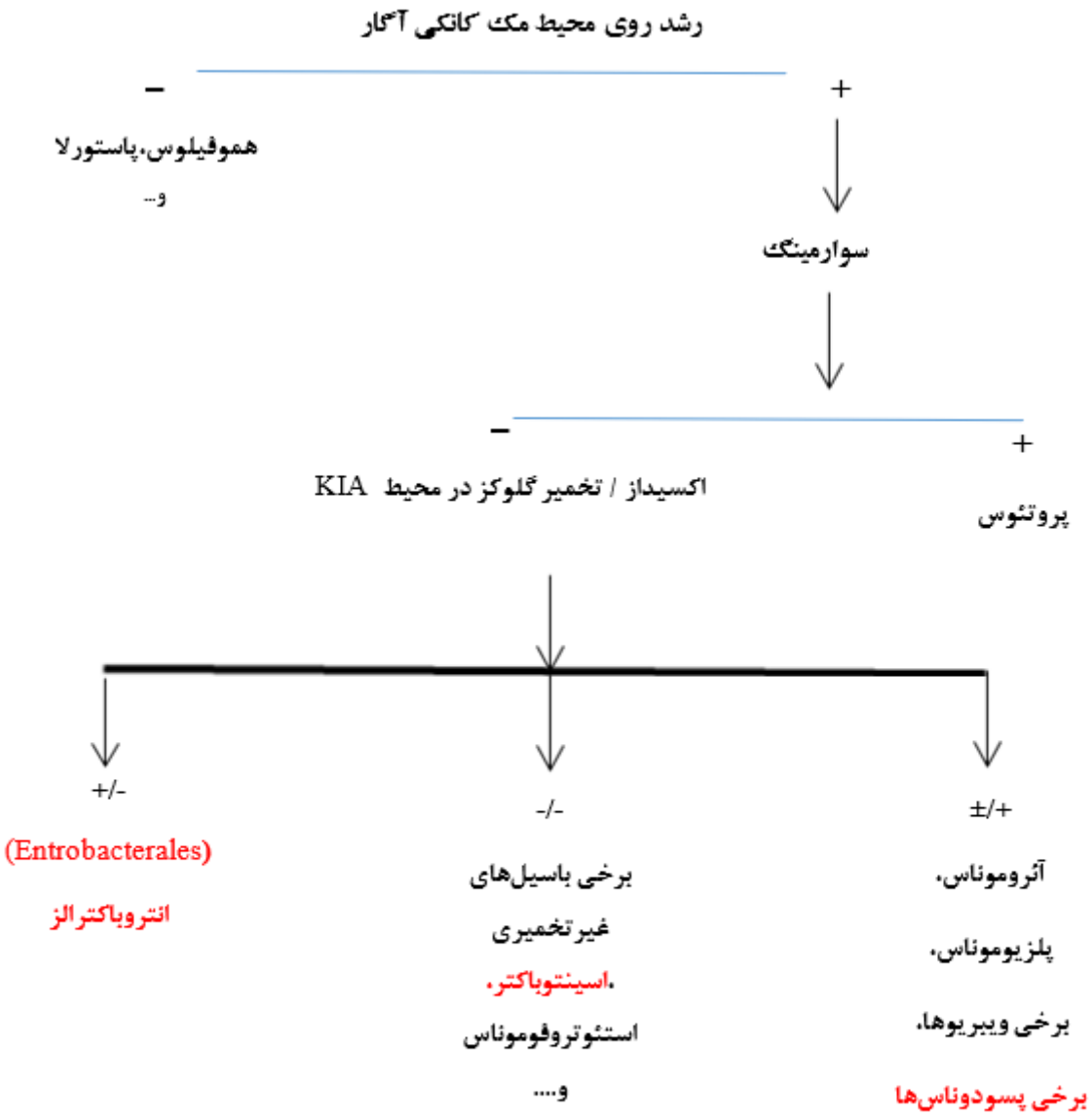
نتیجه:

مثبت: تغییر رنگ محیط به رنگ صورتی (شکلA ۹-۷)

منفی: عدم تغییر رنگ (شکلB ۹-۷)

محدودیت‌ها:

به علت اینکه این واکنش ممکن است زمان طولانی نیاز داشته باشد، امکان دارد، پپتون یا سایر پروتئین‌ها استفاده شده و pH محیط را افزایش دهند و نتیجه مثبت کاذب حاصل شود.



نمودار۲-۷ :تقسیم بندی اولیه باسیل‌های گرم منفی

نام باکتری	KIA	Indoe	MR	VP	سیترات	حرکت	اوره
اشرشیاکلی	A/A Gas^{+} H_2S^{-}	+	+	−	−	+	−
شیگلا	K/A Gas^{-} H_2S^{-}	−	+	−	−	−	−
انتروباکتر	K/A Gas^{+} H_2S^{-}	−	−	+	+	+	−
پروتئوس	K/A Gas^{-} H_2S^{+}	−/+	+	−/+	−/+	+	+

جلسه هشتم: شناسایی باسیل‌های گرم منفی

دستور کار:

بررسی و تفسیر نتایج جلسه قبل

شناسایی باسیل گرم منفی ادراری توسط نمودارها و جدول.

مشاهدهٔ میکروسکوپی باسیل گرم منفی خمیده (مثال ویبریو کلرا)

مشاهدهٔ میکروسکوپی کوکوباسیل گرم منفی (مثال بروسلا)

مشاهدهٔ میکروسکوپی هلیکوباکتر در بافت (رنگ آمیزی ساده)

مشاهدهٔ میکروسکوپی باسیل گرم منفی (مثال اشریشیا کلی،سودوموناس و...)

کشت به روش ایزولاسیون (تمرین جهت آزمون پایان ترم)

جلسه نهم:مرور مطالب تمامی جلسات

دستور کار:

بررسی کشت ایزولاسیون

مشاهده میکروسکوپی تمامی لام‌ها.

مشاهدهٔ و مرور تمامی محیط‌های کشت

مشاهدهٔ میکروسکوپی گسترش‌های بافتی آلوده به ویروس

پاسخ گویی به سوالات دانشجویان و رفع اشکال

جلسه دهم: آزمون پایان ترم

دستور کار:

امضاکارت گزارش کار توسط دانشجو

کشت به روش ایزولاسیون.

رنگ آمیزی لام (g)به روش گرم،طبق دستور کار جزوه.

رنگ آمیزی لام (Z)به روش زیل نلسون،طبق دستور کار جزوه.

مرحله دوم پاسخ گویی به سوالات کتبی ، و تشخیص لام‌های رنگ آمیزی شده .

۱. در کارت کلمه (جلسه آزمون) نوشته شود و مقابل آن امضاء شود.که به منزله حضور دانشجو در آزمون می‌باشد.

۲. مشخصات ثبت شده روی پلیت (نام خانوادگی-شماره کارت گزارش کار)و شماره لامها را با مشخصات خود مطابقت دهید و در صورت اختلاف به مسئول کلاس اطلاع دهید

۳. جهت انجام ایزولاسیون ، ابتدا مایع داخل لوله را به آرامی تکان داده تا یکنواخت گردد.سپس یک لوپ از محلول را در پلیت نوترینت آگار کشت دهید.لازم به ذکر است ،کشت در کنار شعله انجام شود و از استریل کردن لوپ در پایان کار اطمینان حاصل فرمایید.پلیت کشت داده شده را روی کارت گزارش کار خود قرار دهید تا جمع آوری گردد

۴. جهت رنگ آمیزی لامها ،ابتدا سمت گسترش را تعیین نمایید .سپس طبق دستور کار جزوه،رنگ آمیزی نمایید.لامها را بدون خشک کردن بر روی کارت گزارش کار خود قرار دهید تا جمع آوری گردد.

۵. امکان گرفتن پلیت و لام مجدد وجود ندارد،لذا در انجام آزمایشات دقت فرمایید.

۶. پاسخ گویی به سوالات کتبی می‌باشد.

با آرزوی موفقیت

منبع

1. Patricia M. Tille .Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.South Dakota State University Brookings, South Dakota Thirteen edition,2022.

2. W. Procop, Deirdre L. Church, Geraldine S. Hall, William M. Janda, Elmer. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology . PHiladelpHia : Wolters Kluwer Health, Seventh edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2017.

3. Leber, Amy L.Clinical Microbiology Procedures Handbook. Department of Laboratory Medicine, Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio.4th edition. Washington, DC : ASM Press, 2016.

4. 4. Connie R.Mahon,Donald C. Lehman.Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier Inc, 2023.