دانشگاه علوم پزشکی ایلام
دانشکده پزشکی
گروه میکرب شناسی

درسنامه عملی میکروب شناسی پزشکی
ویژه دانشجویان پزشکی

تهیه و گرد آوری : دکتر مروت طاهری کلانی
علی همتیان

۱۳۸۸

بسمه تعالی

توجه دانشجویان محترم را به رعایت نکات زیر در آزمایشگاه میکروب شناسی جلب می نمایند:

الف : نکات ایمنی

۱- بدون روپوش به آزمایشگاه وارد نشوید . در آزمایشگاه دگمه های روپوش را بسته و آن را دست کم یک بار در هفته، جداگانه و با محلول ضد عفونی کننده بشوئید.

۲- در هنگام ورود به آزمایشگاه ، به همراه داشتن کارت شناسایی ، درسنامهٔ عملی، دستمال کاغذی ، گیره فلزی ، **ماژیک** و **کبریت** الزامی است.

۳- نظر به اینکه برای انجام آزمایشات ، باکتریهای بیماری زا در اختیار شما قرار می گیرد، لذا در آزماشگاه از خوردن ، آشامیدن، استعمال دخانیات و دست زدن به سر و صورت اکیداً خودداری فرمائید.

۴- وسایل شخصی (کیف، کتاب، عینک ، ساعت و ...) را روی میز آزمایشگاه که احتمال آلودگی آنها زیاد است، قرار ندهید. حتی الامکان از آوردن وسایل اضافی خودداری نمایید.

۵- درصورت ابتلا به بیماری خاص و یا وجود زخم و بریدگی در دستهایتان ، قبل از شروع کار به مسؤول آزمایشگاه مراجعه نمایید.

۶- چنانچه در حین انجام کار یکی از محیطهای کشت شکست و یا از محیط مایع آلوده قطراتی روی میز ریخت ، به منظور جلوگیری از انتشار آلودگی ، مسؤول آزمایشگاه را مطلع کرده تا محل را ضد عفونی نمایند.

۷- لام و سوابهای استفاده شده را در ظروف محتوی محلول ضد عفونی که روی میزها قرار داده شده است بگذارید.

۸- بعد از اتمام کار، چراغ گاز را خاموش و شیر اصلی آن را ببندید. پس از رنگ آمیزی، شیشه های حاوی رنگ را در محل اصلی خود قرار دهید. بعد از انجام کار، عدسی میکروسکوپ را با کاغذ مخصوص پاک کرده و میز کار را تمیز نمائید.

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

۱۰- قبل از ترک آزمایشگاه حتماً دستهای خود را با آب و صابون و مادهٔ ضد عفونی بشویید.

ب : نکات انضباطی

۱- انجام کارهای عملی میکروب شناسی در آزمایشگاه می بایستی در نهایت نظم ، سکوت، دقت و در کنار شعله صورت گیرد، لذا، از دانشجویان درخواست می شود در طول برگزاری کلاس، این نکات را رعایت و محل خود را تغییر ندهید.

۲- در صورت غیبت بیش از دو جلسه در کلاس عملی (به هر دلیلی) ، دانشجو از حضور در کلاسهای بعدی معذور و حق شرکت در امتحان را نخواهدداشت.

۳- حضور به موقع دانشجو در کلاس عملی الزامی است و هر گونه غیبت موجه یا تأخیر در کلاسهای عملی ، منجر به کسر نمره این درس خواهد شد.

۴- توصیه می گردد نسبت به حفظ وسایل آزمایشگاه و لامهای اختصاصی نمایشی (Demonstration) کوشش نمایید، در غیر این صورت با افراد نامرتب برابر مقررات رفتار خواهد شد.

جلسهٔ اول: آشنایی با آزمایشگاه میکروب شناسی واستریلیزاسیون

دستور کار:

۱- نحوه کار با اتوکلاو

۲- نحوه کار بافور

استریلیزاسیون به معنی از بین بردن کلیه اشکال میکروبی اعم از باکتری به شکل وژتاتیو (Vegetative) با اسپور، ویروس ، قارچ ، تکه یاخته و ... می باشد. فرآیند استریلیزاسیون با استفاده از حرارت، صافی، اشعه، مواد شیمیایی و... صورت می گیرد. استفاده از حرارت عملی ترین روش استریلیزاسیون است. در آزمایشگاه باکتریولوژی ، وسایل مصرفی ، لوازم شیشه ای، فلزی و محیطهای آلوده میکروبی با حرارت و محیطهای کشت با حرارت و صافی و هوای آزمایشگاه توسط اشعه ماورای بنفش استریل می گردد.

حرارت

هنگام استفاده ازحرارت باید دو عامل را در نظر گرفت:

درجه حرارت (براساس نقطه مرگ حرارتی)[1] و مدت زمانی (براساس زمان مرگ حرارتی[2]) که جسم یا ماده استریل شدنی باید در معرض آن قرار گیرد.

[1] - Thermal death point
[2] - Thermal death time

نقطه مرگ حرارتی : حداقل درجه حرارتی که در مدت ده دقیقه کلیه فرم های میکروبی را از بین می برد.

زمان مرگ حرارتی : زمانی است که کلیه فرم های میکروبی از جمله اسپورها در درجه حرارتی خاص از بین می روند.

روشهای استفاده از حرارت عبارتند از : حرارت خشک و حرارت مرطوب.

الف) حرارت خشک (Dry heat)

حرارت خشک برای استریلیزاسیون وسایل شیشه ای ، فلزی ، مواد مقاوم به حرارت بالا، روغنهای غیرقابل نفوذ نسبت به بخار آب ، موم و پودرها، مناسب است. روشهای استفاده از حرارت خشک عبارتند از :

۱- **استفاده از شعله مستقیم :** برای استریل کردن فیلدوپلاتین (آنس یا لوپ) که وسیلهٔ برداشت باکتری است، بکار می رود. در این روش فیلد و پلاتین را بطور عمودی روی شعله قرار می دهیم، تا قسمت انتهایی آن که از جنس آلیاژ مخصوص است، کاملاً سرخ گردد.

۲- **عبور دادن ازروی شعله (Flaming) :** که برای از بین بردن میکروارگانیسمهای وژتاتیو در سطح تیغ اسکالپل ، لامهای شیشه ای ، دهانه لوله های آزمایش و بطری ها بکار می رود. در این حالت وسیله مورد نظر را از روی شعله به آرامی عبور می دهیم.

۳- هوای داغ (Hot air): برای استریل کردن وسایل شیشه ای مانند لوله آزمایش ، پلیت شیشه ای ، فلاسک ، پی پت و ابزار فلزی مانند فورسپس ، اسکالپل ، پودر و روغنها از هوای داغ استفاده می گردد. در این روش از دستگاهی به نام فور (اجاق پاستور یا اُون (Oven) استفاده می شود. فور محفظه ای است دو جداره از جنس فلز که بین دو جدار آن برای

جلوگیری از انتقال حرارت ، مواد عایق قرار داده اند. این دستگاه مجهز به ترمومتر، ترموستات و تایمر است.

روش کار:

کلیه وسایل خوب شسته شوند و خشک گردند. سرلوله های آزمایش باید با پنبهٔ غیر هیدروفیل (دوبار حلاجی شده) یا سرپوشی از جنس فلز، تفلون یا پلی پروپیلن مسدود شده باشد. سرپی پتها را تا عمق ۲cm پنبه می گذاریم. روغن و پودرها را در ظروف فلزی یا شیشه ای می ریزیم، بطوریکه وزن آنها از ۱۰ گرم و عمق آن از یک سانتی متر تجاوز نکند.

- وسایل آماده شده را با حفظ فاصله در داخل محفظه دستگاه قرار می دهیم. حفظ فاصله به منظور عبور متعادل جریان هوای گرم در بین این وسایل ضروری است.
- درب فور را بسته و دستگاه را به جرین برق وصل می کنیم.
- درجه حرارت را تنظیم نموده و وقتی دما به میزان دلخواه رسید زمان مورد نظر را با تایمر مشخص می نماییم. پس از اتمام فرآیند استریلیزاسیون فور را خاموش می کنیم. باید توجه داشت که قبل از سرد شدن فور، درب آن را باز نکنیم. زیرا ورود ناگهانی هوای سرد موجب ترک برداشتن وسایل شیشه ای می گردد.

جدول زیر رابطهٔ بین دما و زمان را در هنگام استفاده از فور نشان می دهد:

رابطه بین دما و زمان [۳]	
حرارت (C)	زمان (دقیقه)
۱۵۰	۱۵۰
۱۶۰	۱۲۰
۱۷۰	۶۰

[3] - Disinfection, Sterilization and Preservation 4th. Edition. Seymours. Block 1991

۱۸۰	۳۰

ضمناً ازروش پرتوتابی توسط اشعه مادون قرمز با ایجاد گرما، می توان برای استریل کردن ابزار شیشه ای و فلزی استفاده نمود.

ب) حرارت مرطوب (Moist Heat)

میکروارگانیسم ها و اسپور آنها به علت نفوذ بهتر حرارت مرطوب در درجه حرارتهای پایین تری از بین می روند.

۱- حرارت مرطوب تحت فشار:

این روش برای استریل کردن محیطهای کشت مصرفی، محیطهای کشت آلوده میکروبی ، وسایل و مواد دور ریختنی به کار می رود. به همین منظور در آزمایشگاه باکتریولوژی از حرارت مرطوب تحت فشار با استفاده از دستگاهی به نام اتوکلاو (Autoclave) بهره می جوییم . ضمناً برای استریل کردن وسایل فلزی و شیشه ای می توان از اتو کلاوهایی مجهز به سیستم تخلیه بخار یا اتوکلاوهای با درجه حرارت پایین همراه با بخار فرمالدئید استفاده کرد.

روش کار :

- آب کافی در بخش زیرین محفظهٔ اتوکلاو می ریزیم.
- ظروف محتوی محیط های کشت و وسایل را با بسته بندی مناسب و با توجه به ظرفیت دستگاه، در داخل اتوکلاو قرار می دهیم. در موقع استفاده از دستگاه باید اطمینان حاصل کرد که حرارت به تمام قسمتهای وسایل استریل شدنی برسد. بنابراین باید از پیچیدن وسایل در پوششهایی که قابلیت هدایت گرما را ندارند(مانند فویل آلومینیومی) خودداری کرد.

- درب اتوکلاو را بسته و شیر خروج هوا را باز می کنیم.

- اتوکلاو را به جریان برق وصل می کنیم.

- با گرم شدن دستگاه، آب جوش آمده و بخار وارد محفظهٔ اصلی اتوکلاو می گردد. ابتدا بخار با هوای موجود در داخل محفظه از شیر خروجی هوا، خارج شده و پس از خروج کامل هوا، شیر را بسته و وقتی فشار به سطح دلخواه رسید، آن را با پیچ کنترل (Pressurestate) ثابت می نماییم. معمولاً در فشار ۱۵ پاوند براینچ مربع (P.S.I) درجهٔ حرارت به ۱۲۱c̊ خواهد رسید و این درجه حرارتی است که معمولاً برای استریل کردن از آن استفاده می شود. زمان لازم برای استریلیزاسیون اکثر محیطهای کشت ۱۵ دقیقه است. (زمان لازم برای استریلیزاسیون به حجم محیط کشت نیز بستگی دارد.)[۴]

- پس از اتمام زمان ، دستگاه را خاموش و صبر می کنیم تا اتوکلاو به آهستگی سرد شود و وقتی فشار سنج، فشار اتمسفر محیط را نشان داد، شیرخروج هوا را به آرامی باز کرده، تا بخار کم کم خارج شود. پس از خروج کامل بخار، درب اتوکلاو را باز و وسایل را خارج می کنیم. زیرا کاهش ناگهانی فشار موجب سررفتن مایعات می شود . تأخیر در باز کردن شیر نیز موجب می شود که فشار از حد اتمسفر پایین تر رفته و در نتیجه آب بیشتری از محیط تبخیر گردد.

رابطهٔ بین فشار و حرارت اتوکلاو[۵]

حرارت	فشار		زمان
	bar	P.S.I	
۱۱۵-۱۱۸	۰/۷	۱۰	۳۰
۱۲۰-۱۲۴	۱/۱	۱۵	۱۵
۱۳۴-۱۳۸	۲/۲	۲۷-۳۰	۳

[4] - Practical medical microbiology. 13th edition Mackie & McCartney 1989
[5] - Practical medical microbiology. 13th edition Mackie & McCartney 1989

۲- **تیندالیزاسیون (Tyndalization) یا حرارت نوبه ای :** برای استریل کردن مواد حساس به حرارت بالای ۱۰۰c̊(مانند سرم، قند و ...) از این روش استفاده می شود.سه روز متوالی و هربار ۴۵-۲۰ دقیقه ماده مورد نظر را در معرض حرارت ۸۰ یا ۱۰۰c̊ قرار داده و در این فاصله آنها را در دمای اطاق نگهداری می کنیم. در روز اول کلیه اشکال وژتاتیو از بین رفته ولی اسپورها باقی مانده و طی ۲۴ ساعت اول به اشکال وژتاتیو تبدیل می شوند. روز دوم این اشکال نیز از بین می روند. روز سوم جهت کنترل و حصول اطمینان از عمل استریلیزاسیون است. ضمناً روشهای دیگری مانند جوشانیدن (boiling) و پاستوریزاسیون (Pasteurization) با استفاده از حرارت مرطوب نیز انجام می شود.

فیلتراسیون (Filteration) :

محلولها و ترکیبات حساس به حرارت را می توان با گذراندن از صافی ها استریل کرد. به این منظور از فیلترهای مختلفی استفاده می گردد. امروزه فیلترهای مانند شامبرلند (Chamberland) از خاک چینی ، برک فلد (Berkfeld) از خاک دیاتومه، سایتز (seitz) از جنس پنبه نسوز جای خود را به فیلترهای غشایی به صورت صفحات مشبک از جنس استات سلولز داده اند که از نظر بیولوژیکی خنثی می باشند. فیلترهای غشایی (میلی پور) در منافذی به اندازه های ۰/۱۴ تا ۰/۲۳ میکرون در دسترس است. فیلتر ۰/۲۲ میکرونی بیشترین کاربرد را دارد، چون اندازه منفذ آن بحدی است که باکتریها نمی توانند از آن رد شوند در حالی که ویروسها عبور می نمایند.

اشعه ماوراء بنفش Ultraviolet radiation

برای استریل کردن هوای آزمایشگاه ، اطاق عمل و راهروهای بیمارستانی از لامپهای جیوه ای استفاده می گردد. برای استریل کردن سطحی برابر یک سانتیمتر مربع در فاصله یک متری ازیک لامپ ۱۵وات و با دوز کشنده ۳۸ میکروات در ثانیه استفاده می گردد.

اشعه UV با ایجاد دیمرهای تیمین در باکتریها باعث مرگ آنها می شود .این اشعه دارای طول موج ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر است که به سه دسته تقسیم می شود :

۱ – UV A دارای طول موج ۳۱۵ تا ۴۰۰ نانومتراست که باعث ایجاد تغییرات در پوست وسرطان میشود .

۲ – UV B دارای طول موج ۲۸۰ تا ۳۱۵ نانومتراست که باعث آفتاب سوختگی می شود .

۳ – UV C دارای طول موج ۲۰۰ تا ۲۸۰ نانومتر است که باعث موتاسیون در سلول و مرگ آن می شود.

نکته : اغلب لامپ های uv تجاری دارای طول موج ۲۵۴nm بوده که ماکزیمم جذب بازها دراین رنج است

× به دلیل آنکه ، اشعه uv نمی تواند در جامدات – اجسام کدر ، وسایل جاذب نور ، نفوذ کند به طور عمده برای استریل کردن سطوح هوا و مواد دیگر مثل آب به کار می رود . همچنین برای تخریب مقادیر کم آلودگیهای DNA در کابینت ها (هود) و مجموع وسایل موجود در آزمایشگاه PCR استفاده می شود .

جلسهٔ دوم وسوم: روش مطالعه باکتریها

دستور کار:

۱- تهیهٔ گسترش از ترشحات حلق یا شیارلثه و رنگ آمیزی به روش گرم

۲- رنگ آمیزی گسترش تهیه شده به روش گرم

۳- نحوه کار با میکروسکوپ

۴- مشاهدهٔ میکروسکوپی فلاژل باکتریها در رنگ آمیزی اختصاصی

۵- مشاهده میکروسکوپی کپسول باکتریها

به منظور شناسایی، تشخیص و تعیین هویت باکتریها از روشهای زیر استفاده می شود:

۱- آزمایش مستقیم

۲- کشت نمونه

۳- مطالعه خواص حیاتی باکتریها

۴- تلقیح به حیوان حساس

۵- آزمایشات سرمی

۶- روشهای ژنتیکی (براساس شناسایی DNA باکتریها)

آزمایش مستقیم یا میکروسکوپی (Microscopic examination)

آزمایش میکروسکوپی نمونه های بالینی و مایعات، ترشحات بدن و نسوج ،روشی ساده برای تشخیص اولیه بیماریهای عفونی می باشد. در بسیاری از موارد، این آزمایش تعیین عامل بیماریزا را بطور دقیق ممکن می سازد. برای مثال می توان بورلیا را در گسترش خون محیطی بیمار مبتلا به تب راجعه تشخیص داد. ضمناً در آزمایش مستقیم باکتریها را از لحاظ شکل ، اندازه ، رنگ آمیزی و حرکت مورد مطالعه قرار می دهند. آزمایش میکروسکوپی به دو طریق انجام می شود:

۱- آزمایش میکروسکوپی باکتریهای زنده بدون رنگ آمیزی (wet mount)

۲- آزمایش میکروسکوپی باکتریها پس از رنگ آمیزی

انجام آزمایشهای فوق نیاز به وسایلی دارد از جمله : میکروسکوپ نوری ، لام ، لامل، چراغ الکلی یا چراغ گاز، فیلدوپلاتین (انس) ، سواب یا اکوویون، گیره یا پنس ، انواع رنگهای مورد نیاز، روغن سدر.

۱- آزمایش میکروسکوپی باکتری های زنده بدون رنگ آمیزی :

این روش به منظور مشاهده حرکت باکتریها، بررسی سلولهای موجود در نمونه و گاهی به منظور تشخیص یک باکتری بکار می رود. به طور مثال ترشحات دستگاه تناسلی بیماران مشکوک ، جهت تشخیص تروپونماپالیدوم (عامل بیماری سیفلیس) توسط میکروسکوپ با زمینه تاریک ، Dark) (Field روشی شناخته است. در این روش ترشحات بیمار را روی لام تمیزی قرار داده و پس از قرار دادن لامل روی نمونه ، آنرا مطالعه می نمایند.

در آزمایش میکروسکوپی بدون رنگ آمیزی جهت مشاهدهٔ حرکت باکتریها، باید توجه داشت که باکتریهای متحرک در تمام جهات حرکت می نمایند و کاملاً تغییر محل می دهند (Active motion) و این حرکت باید از حرکت براونی (Brownian motion) و حرکت شناور خود مایع (Swimming motion) تشخیص داده شود. برای مشاهدهٔ حرکت فعال باکتریها بهتر است روش قطره معلق (Hanging drop) با استفاده از لام گوده انجام شود .

۲- آزمایش میکروسکوپی باکتریها پس از رنگ آمیزی :

با وجود پیشرفتهای تکنیکی فراوان در زمینه باکتریولوژی، مطالعه گسترش رنگ آمیزی شده هنوز به عنوان بهترین روش تشخیص فوری عفونت های باکتریال مطرح است. در این روش ، بررسی ترشحات، مواد آسپیره شده، مایعات بدنی نظیر مایع مغزی نخاعی (C.S.F) و ادرار از اهمیت خاصی برخوردار است. در این روش علاوه بر مشاهدهٔ شکل ، شناسایی و پی بردن به اندازه باکتریها و بررسی سلولهای موجود در نمونه، تشخیص فرآیند التهابی نیز امکان پذیر است.

مراحل آزمایش میکروسکوپی عبارتند از :

الف – تهیه گسترش Smear preparation

ب – خشک کردن Drying

ج – ثابت کردن Fixation

د – رنگ آمیزی Staining

الف) تهیه گسترش :

گسترش ممکن است از محیط های کشت مایع ، جامد و یا نمونه های بالینی تهیه شود.

تهیه گسترش از محیط مایع :

لوله آزمایش محتوی مایع را به آرامی تکان داده تا نمونه مخلوط گردد . البته باید توجه داشته که دهانه لوله آلوده نگردد. لوپ را استریل نموده و پس از سرد شدن، داخل مایع کرده، یک لوپ پر از مایع برداشته ، در وسط لام قرار می دهیم و مانند ورقه نازکی می گسترانیم. باید دقت کرد که گسترش خیلی ضخیم یا نازک نبوده و از کناره های لام نیز فاصله داشته باشد.

تهیه گسترش از محیط جامد:

در وسط لام تمیزی یک قطره سرم فیزیولوژی یا آب گذاشته سپس لوپ را استریل کرده و پس از سرد شدن، مقدار کمی از کلونی را برداشته و با قطرهٔ روی لام شیرابهٔ یکنواختی تهیه می کنیم. سپس آنها را روی لام می گسترانیم، بطوریکه گسترش ضخیم یا نازک نباشد و از کناره های لام نیز فاصله داشته باشد.

ب) خشک کردن :

پس از تهیه گسترش صبر می کنیم تا سطح آن در دمای معمولی آزمایشگاه خشک گردد. برای خشک کردن نباید از روشهای دیگر استفاده کرد.

ج) ثابت کردن :

چون ممکن است براثر رنگ آمیزی و شستشوی مکرر، باکتریها از روی لام کنده شوند، لازم است گسترش را ثابت نماییم تا بطریقی باکتریها مرده و به سطح لام بچسبند. برای ثابت کردن از حرارت

یا متانول استفاده می شود. روش متداول استفاده از حرارت است. برای این مقصود بـه آهسـتگی لام را ۳ یا ۴ مرتبه از روی شعله چراغ عبور می دهیم. باید دقت کـرد کـه حـرارت زیـاد نباشـد. چـون ممکن است باکتری و سلولها، تخریب و غیر قابل تشخیص گردند و اگـر حـرارت کـم باشـد، ممکـن است باکتریها ثابت نشوند. برای در نظر گرفتن حرارت مناسب که حـدود ۷۰c̊ اسـت، بایـد لام را بـا دست امتحان کنیم، حرارت باید به حدی باشد که دست را نسوزاند. برای ثابت کردن با الکل ، ابتـدا روی گسترش الکل متیلیک ریخته، اضافه آن را خالی نموده و صبر می کنیم تا بقایای الکل تبخیـر گردد. بطـور کلی ثابـت کردن باعث انعقاد پروتئینهای باکتری و سـلولها مـی گـردد و بـه لام مـی چسبند و شسته نمی شوند.

د) رنگ آمیزی :

منظور از رنگ آمیزی مشاهدهٔ میکروارگانیسمها با استفاده از میکروسکوپ نوری است.

اهداف رنگ آمیزی

۱- نشان دادن میکروارگانیسمها و سلولهای موجود در نمونه.

۲- مشاهدهٔ اجزایی مانند فلاژل، اسپور، کپسول، دانه های متاکروماتیک و ...

۳- تفکیک میکروارگانیسمها براساس خواصی چون ساختمان شیمیایی دیـواره سـلول. (مثـال رنگ آمیزی گرم).

اصول رنگ آمیزی

رنگ پذیری به واسطهٔ وجود گروههای کروموفور موجود در رنگها می باشد. رنگها را براسـاس ریشـهٔ آنیونیک و کاتیونیک به دو دسته رنگهای بازی و اسیدی تقسیم می نمایند.

رنگهای اسیدی مانند ائـوزین، روز بنگـال و فوشـین اسـیدی، رنگهـایی آنیونیـک بـوده و دارای بـار الکتریکی منفی می باشد. این رنگها به علت داشـتن بـارمنفی (-C00H) و یـا (-OH) بـه اجزایـی از

سلول که دارای بار مثبت هستند اتصال پیدا می کنند. رنگهای بازی مثل متیلن بلو، فوشین بازی ، کریستال ویوله، سافرانین و مالاشیت گرین رنگهای کاتیونیک هستند وبه علت داشتن بار مثبت با اجزایی از سلول که دارای بار منفی می باشند، اتصال می یابند. غالباً سطح باکتری دارای خصوصیات اسیدی است، زیرا تعداد زیادی از گروههای کربوکسیل در سطح سلول قرار دارد. گروههای کربوکسیل (CooH-) بنیانهای اسیدی در اسیدهای آمینه هستند. هزاران اسید آمینه در دیواره یاخته قرار دارد. با یونیزاسیون گروههای کربوکسیل سطح یاخته دارای بار منفی می شود. $CooH \rightarrow Coo^{-} + ^{+}$ به همین دلیل در میکروبشناسی برای رنگ آمیزی، بیشتر از رنگهای بازی (دارای بار مثبت) استفاده می شود و رنگ آمیزی براساس ایجاد پیوندهای یونی بین بارهای مخالف می باشد.

رنگهای بازی را بصورت نمک می سازند. مانند متیلن بلو که بصورت کلرورمتیلن بلو تهیه می شود و در رنگ آمیزی، کلرورمتیلن بلو یونیزه می شود و بخش رنگی آن، میتلن بلو، با سطح یاخته بوسیلهٔ ایجاد پیوند یونی واکنش می دهد و باکتری به صورت رنگی (آبی) مشاهده می شود.

روشهای رنگ آمیزی

۱- رنگ آمیزی ساده : (Simple Staining)

در این نوع رنگ آمیزی تنها از یک رنگ مانند میتلن بلو استفاده می شود. متیلن بلو رنگ آنیلینی است که بسیاری از باکتریها، این رنگ را بیشتر از سلولهای دیگر به خود جذب می کنند.

بطور مثال در رنگ آمیزی مایع نخاع و یا ترشحات مجرای ادراری تناسلی که تشخیص یک باکتری گرم منفی در زمینهٔ قرمز مشکل است، از متیلن بلو برای رنگ آمیزی استفاده می کنند. در این روش متیلن بلو را روی گسترش ریخته و پس از یک دقیقه لام را با آب شستشو می دهیم. به این ترتیب کلیه باکتریها و سلولهای موجود در نمونه به رنگ آبی دیده می شوند.

۲- رنگ آمیزی منفی : (Negative staining)

در این روش از رنگهایی مانند نیگروزین یا مرکب چین استفاده می شود. روی لام قطره ای از کشت باکتری را با رنگ مخلوط و گسترش تهیه می نماییم. چون رنگ نمی تواند با داخل باکتری نفوذ نماید، باکتریها در زمینه سیاه ، بی رنگ دیده می شوند.

۳- رنگ آمیزی افتراقی (Differential staining)

در این روش از چند محلول رنگی استفاده می شود تا تفاوت موجود بین ترکیبات شیمیایی منجر به افتراق باکتریها از یکدیگر گردد. در میکروبشناسی پزشکی بیشتر از رنگ آمیزی گرم (Gram) و اسید فست (Acid fast) استفاده می شود:

۱- رنگ آمیزی گرم : (Gram staining)

این تکنیک در سال ۱۸۸۴ توسط خانم کریستین گرم ابداع گردید. در این روش باکتریها براساس ساختمان شیمیایی دیواره سلولی به دو رنگ قرمز و بنفش دیده می شوند. در این رنگ آمیزی از ۴ محلول مختلف استفاده می شود:

رنگ اول **کریستال ویوله** Hexamethyl-p-rosanaline chloride است ، که کلیه باکتریها را به رنگ بنفش در می آورد. سپس محلول **لوگل** (Potassium-Iodide-Iodine solution) اضافه گشته و یُد جای کلر را در مولکول کریستال ویوله می گیرد. (عمل دندانه زدن به منظور تثبیت رنگ در دیواره سلولی می باشد). ترکیب حاصله در آب نامحلول بوده و باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی واکنش یکسانی دارند. وقتی در مرحله بعد **بی رنگ کننده** اضافه شود، رنگ تنها از باکتریهای گرم منفی خارج می گردد. اگر چه دلایل زیادی برای این مسأله آمده است از جمله تفاوت در میزان اتصال به منیزیم، ریبونوکلئازها ، پلی آمینها، اسیدهای نوکلئیک و یا تفاوت در قدرت نفوذ پذیری رنگ بخاطر اختلاف در ساختمان، ولی مشاهدات اخیر نشان می دهد که بی رنگ کننده به غشاء

خارجی باکتریهای گرم منفی آسیب رسانده و باعث خروج کمپلکس کریستال ویوله – ید می گردد. سپس رنگ زمینه یعنی **سافرانین** اضافه می شود و باکتریهای گرم منفی به رنگ قرمز در می آیند و باکتریهای گرم مثبت که دیوارهٔ سلولی آنها به دلایلی آسیب دیده اند(مانند سلولهای پیر و مرده) رنگ زمینه را گرفته و موجب اشتباه در تشخیص می گردد.

□ روش کار :

۱- ابتدا بروی گسترش ثابت شده، چند قطره محلول کریستال ویوله ریخته مدت یک دقیقه صبر می کنیم.

۲- لام را با جریان آرام آب شسته ، چند قطره لوگل روی گسترش ریخته و پس از ۴۵ ثانیه آن را خالی می کنیم.

۳- چند قطره الکل اتیلیک روی لام می ریزیم ، ۱۵ ثانیه صبر کرده و آن را خالی نموده و سپس شستشو می دهیم.

۴- گسترش را مدت ۳۰ ثانیه تحت تأثیر محلول سافرانین قرار می دهیم. سپس رنگ را خالی کرده و لام را می شوییم. پس از خشک کردن ، روی گسترش یک قطره روغن سدر گذاشته ، زیر میکروسکوپ با عدسی روغنی و درشت نمایی ۱۰۰ مطالعه می کنیم. در آزمایش میکروسکوپی باکتریهای گرم مثبت به رنگ بنفش و باکتریهای گرم منفی به رنگ صورتی یا قرمز دیده خواهد شد.

۲- رنگ آمیزی اسید فست : (Acid fast staining)

برخی باکتریها مانند مایکوباکتریا، رنگ خود را پس از بیرنگ کردن با اسید یا اسید الکل ، حفظ می نمایند. این خصوصیت به دلیل وجود مایکولیک اسید در دیوارهٔ سلولی این باکتریهاست. به این منظور از حرارت ، حلالهای آلی و یا دترجنتها برای تسهیل عمل رنگ آمیزی استفاده می شود.

رنـگ آمیـزی اسیدفسـت بـه سـه روش زیـل نیلسـون (Ziehl-Neelsen) کینیـون (Kinyoun) و فلوروکروم (Flourochrome) انجام می گیرد، که در این درسنامه روشهای زیل نلسون و فلـوروکروم در بحث مایکوباکتریوم آمده است.

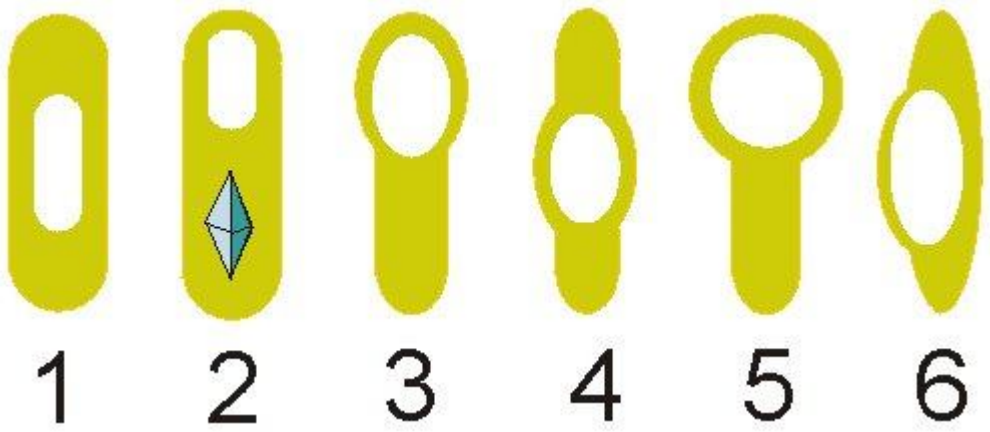
IV – رنگ آمیزی اختصاصی:

تفکیک انواعی از باکتریها، گاهی با رنگ آمیزی اختصاصی و مشاهده اجزای خاصی از باکتری ماننـد اسپور، فلاژل ، کپسول و .... انجام می شود.

الف) رنگ آمیزی اسپور:

دیوارۀ اسپورها مانعی برای عبور مواد به داخل و خارج اسپور است. به این دلیل از افزایش زمان رنگ آمیزی و حرارت برای نفوذ رنگ به اسپور استفاده می شود.

اسپورها به دو روش سبز مالاشیت و مولر رنگ آمیزی می شوند. (روش کار در بحث باسیلوسها آمـده است.)



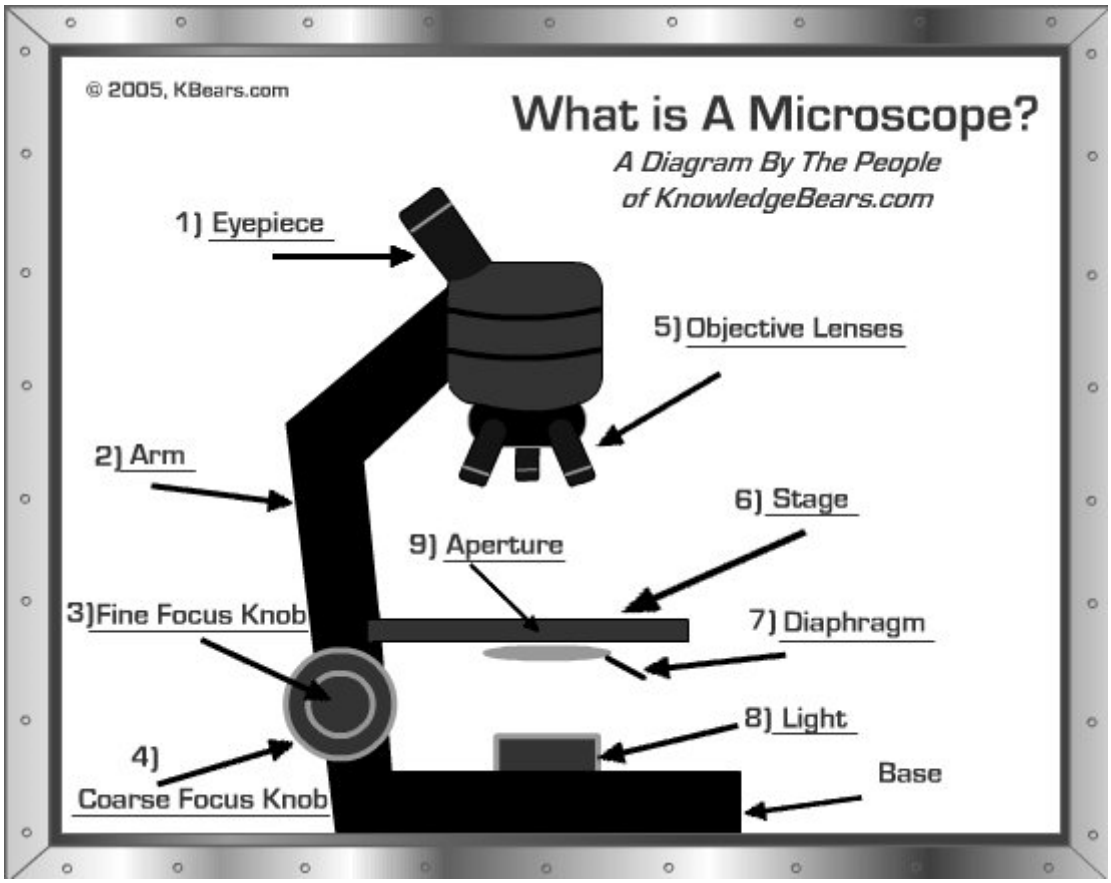
ب) رنگ آمیزی فونتانا:

اسپیروکتـها به دلیل قطر کم ، با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده نیستند. لـذا از محلولهـای خـاص برای ضخیم تر شدن قطر آنها استفاده می گردد. رنگ آمیزی فونتانا برای مشـاهدهٔ ترپـونم پالیـدوم عامل بیماری سیفلیس انجام می شود. (روش کار در بحث ترپونم آمده است).

ج) رنگ آمیزی آلبرت:

دانه های متاکروماتیک (گرانولهای ولوتین (Volutin granules) تجمعی از پلـی فسـفاتهای غیرآلـی هستندکه پس از رنگ آمیزی با یک رنگ بازی مانند متیلن بلو و یـا تولوئیـدین بلـو بـه رنـگ سـیاه دیده می شوند. این روش برای مشاهدهٔ دانه های متاکروماتیک در جنس کورینه باکتریوم و تعدادی دیگر از انواع باکتریها کاربرد دارد. (روش کار در بحث کورینه باکتریوم آمده است).

اجزاء یک میکروسکوپ



ساختمـــان تمام میکروسکوپـــها شامل دو قسمت بدنـــه و پایه است و اجزای زیر به این دو قسمت اتصال می یابند.

- صفحه (stage): به صفحه افقی که لام روی آن قرار می گیرد، گفته می شود. این صـفحه دارای یک گیره (mechanical stage) و یک پیچ کنترل (mechanical stage control) جهـت نگهـداری و جابجا کردن لام در جهات مختلف می باشد.

منبع نور: در قسمت پایه اغلب میکروسکوپها یک منبع نوری قرار دارد. در انواع جدید، لامپ مجهـز به یک سیستم کنترل نور می باشد. بسیاری از میکروسکوپ هـا عـلاوه بـرآن دارای یـک صـافی بـا دانسیتهٔ خنثی (Neutral density) نیز می باشند که معمولاً برای مشاهدهٔ اجرام با بزرگنمایی کمتـر (Low magnification) مورد استفاده قرار می گیرد.

- **عدسی ها :** تمام میکروسکوپها دارای سـه نـوع عدسـی چشـمی ، شـیئی و کندانسـور هسـتند عدسی چشمی (Ocular) که بالای میکروسکوپ قرار داشته و از دو عدسی داخلی بـا درشـت نمـایی

×۱۰ تشکیل شده است. عدسی های شیئی (Objective) نیز از سه عدسی یا بیشتر تشکیل یافته اند و به یک قطعه دوار (Nosepiece) که برروی لام حرکت می کند، اتصال دارند.

- درشت نمایی عدسیها شیئی که برروی اغلب میکروسکوپها بکار رفته اند، به ترتیب ×۱۰ (ضعیف) ، ×۴۵ (قوی خشک و ×۱۰۰ [۶] ، (روغنی یا ایمرسیون) می باشند. سومین عدسی کندانسور است که در زیر صفحه قرار گرفته و موجب متمرکز کردن نور لامپ برلام می گردد.

پیچ تنظیم کننده زیر صفحه ای (substage adjustment knob) باعث بالا رفتن و پایین آمدن کندانسور می گردد. اهرم دیافراگم (Diaphragm lever) برای کنترل میزان نوری که از کندانسور عبور می کند، بکار می رود. پیچ های میزان کننده تصویر (Focusing knobs) شامل پیچهای ماکرومتر (Coarse adjustment knob) و میکرومتر (Fine adjustment knob) بروی بدنه میکروسکوپ ، جهت تنظیم تصویر مورد استفاده قرار می گیرد.

جلسه چهارم:

محیط های کشت

برای شناسایی باکتریها در نمونه های بالینی ، مراحل کشت ، جداسازی و تعیین هویت در آزمایشگاه باکتریولوژی انجام می گیرد. اکثر باکتریها براساس مرفولوژی ، قابل شناسایی نبوده و باید آنها را در محیط های کشت جدا کرده و سپس براساس خواص بیوشیمیایی و سرولوژیکی تعیین هویت نمود. روند مطالعات باکتریها به دو عامل بستگی دارد که عبارتند از احتیاجات غذایی و نیازهای فیزیکی ، برخی از باکتریها می توانند تحت شرایط مختلفی رشد نموده، در حالیکه بعضی نیاز به شرایط خاصی دارند در محیطهای کشت باید منابعی چون کربن، نیتروژن ، فسفر ، گوگرد، املاح معدنی دیگر و فاکتورهای رشد در اختیار باکتری قرار گیرد. باید توجه داشت مقدار این ترکیبات به میزان مشخصی به محیط اضافه شود، چون ممکن است افزایش غلظت آنها موجب

[۶] - جهت کاهش انکسار نور، هنگام استفاده از عدسی ×۱۰۰ ، روغن سدر بکار می بریم

کاهش و یا عدم رشد باکتری گردد. در ضمن بایستی شرایطی چون درجه حرارت ، pH ، نیازهای اتمسفریک و ... را نیز در نظر داشت.

محیطهای آزمایشگاهی را براساس ترکیبات شیمیایی و نحوه مصرف به دو صورت طبقه بندی می نمایند:

الف) طبقه بندی محیط های آزمایشگاهی براساس ترکیب شیمیایی :

براین اساس، محیط ها به دو دسته **سنتتیک** و **غیر سنتتیک** تقسیم می شوند:

اگر تمام ترکیبات سازنده یک محیط به درستی شناسایی و مقدار آنها نیز مشخص شده باشد. به آن محیط سنتتیک (Synthetic) گویند که خود به محیط های ساده (Simple) و محیط های پیچیده (Complex) تقسیم می گردد. محیط های کشت سنتتیک عموماً منابع کربن، انرژی و نیتروژن را در قالب کربوهیدرات ها و اسیدهای آمینه فراهم می نمایند. محیط های سنتتیک ساده حاوی یک منبع کربن و انرژی مانند گلوکز یا لاکتات، یک منبع نیتروژن و نمکهای غیرآلی به عنوان بافر هستند، ولی محیط های سنتتیک کمپلکس علاوه بر موارد فوق حاوی اسیدهای آمینه پورین ، پیریمیدین و دیگر فاکتورهای رشد هستند . جداول شماره ۱ و ۲ ترکیبات شیمیایی یک محیط ساده و پیچیده را نشان می دهد.

بطور کلی محیط های کشت به سه حالت مایع، جامد و نیمه جامد وجود دارد. محیط های مایع را آبگوشت (broth) گویند. جهت ساختن محیط های جامد به آگار را میزان ۲-۱ درصد و در محیطهای نیمه جامد به میزان ۰/۷- ۰/۵ درصد اضافه می نمایند.

آگار: پلی ساکاریدی است با زنجیره طویل(کربوهیدرات کمپلکس) که اساساً از واحدهای د-گالاکتوپیرانوز (D-galactopyranose) ساخته شده است و از جلبک دریایی (seaweed) بدست می آید. آگار بوسیله باکتریها، هضم نمی شود. در دمای ۴۸c̊ مایع و در دماهای پایین تر شروع به جامد شدن می نماید. آگار به میزان ۲-۱ درصد به آبگوشت اضافه شده و این مخلوط پس از استریل

شدن سرد شده و محیطی جامد بدست می آیدکه امکـان ایزولاسـیون و تفریـق باکتریهـا را بـرروی سطح خود فراهم می سازد.

پپتون: ترکیباتی محلول در آب است که از هیدرولیز پروتئینها بدست می آید. هیدرولیز معمـولاً بـه وسیلهٔ آنزیمهای پروتئولیتیک مانند پپسین ، تریپسین و پاپایین انجام می شود. قـبلاً در آزمایشـگاه میکروبشناسی ، محیط های کشت به صورت غیر سنتتیک تهیه می شد. امـا امـروزه محـیط هـا بـه صورت تجارتی به فرم پودر یا کریستال دردسترس است کـه براسـاس دسـتورالعمل موجـود بـرروی شیشه های محیط کشت ساخته می شوند.

ب) طبقه بندی محیط های کشت براساس مصرف آزمایشگاهی :

۱- محیط های پایه : (Basal media)

محیط ساده ای هستند که تقریباً ۸۰ درصـد باکتریهـا در آنهـا رشـد مـی نماینـد. ماننـد آبگوشـت نوترینت (Nutrient broth) ، آبگوشت تریپتی کیس سوی براث (Trypticase soy broth) و محـیط تریپتی کیس سوی آگار(Trypticase soy agar) .

ترکیبات آبگوشت نوترنیت در جدول(۲) آمده است.

۲- محیط های غنی شده : (Enriched media)

اگر به محیط های پایه موادی مانند خون یا سرم اضافه گردد، محیط های غنـی شـده سـاخته مـی شود مانند ژلوز خون دار (Blood agar) و سرم منعقده لفلر.

به طور مثال ژلوز خون دار محیطی است پایه که بعد از استریل و سرد شدن تا ۵۰°c خون دقیبرینه گوسفند یا اسب به میزان ۵٪ به آن اضافه می گردد. این محیط ها برای باکتریهای سخت رشد مناسب می باشند.

۳- محیط های انتخابی : (Selective media)

اگر هدف جدا کردن باکتری خاص باشد، از محیط هایی استفاده می شود که برای باکتری مزبور حالت انتخابی دارد. این محیط ها با اضافه کردن ترکیبات شیمیایی خاص به یک محیط سنتتیک یا غیر سنتتیک تهیه می گردند. این ترکیبات عبارتند از : رنگها (مانند کریستال ویوله) آنتی بیوتیکها، املاح صفراوی و ... که از شد گونه های دیگر جلوگیری می کند. سایر روشهای ممانعت از رشد عبارتند از :

- تغییر در منابع کربن و انرژی
- تثبیت pH
- تنظیم فشار اسمزی
- تغییر میزان اکسیژن

با تغییر نوع و مقدار مواد ممانعت کننده می توان محیط های متفاوتی ساخت

محیطهای مکانکی آگار (MacConkey agar) ، سالمونلا – شیگلا آگار (**S**almonella-**S**higella agar) و دزوکسی کلات آگار (**D**esoxy**C**holate **A**gar) نمونه هایی از این نوع هستند.

در محیط مکانکی ، کریستال ویوله و نمکهای صفراوی و در محیط های SS و DC نمکهای صفراوی ممانعت کننده باکتریهای گرم مثبت هستند.

۴- محیط های افتراقی (Differential media)

محیط هایی هستند که انواع باکتریها را از یکدیگر تمیز می دهند. این محیط ها حاوی ترکیباتی بوده که در نتیجه فعالیتهای متابولیکی باکتریها، تغییر کرده و این تغییرات بوسیله اندیکاتور یا معرف قابل مشاهده است. محیط های مکانکی و دزاکسی کلات آگار، محیط های انتخابی و افتراقی

هستند. این محیط ها حاوی قند لاکتوز و معرف نوترال رد است . اگر اشریشیاکلی و سالمونلا را روی محیط آگار غذایی کشت دهیم، هر دو ارگانیسم تولید پرگنه سفید متمایل به خاکستری می نمایند. ولی اگر آنها را روی محیط مکانکی کشت دهیم، اشریشیاکلی تولید پرگنه صورتی و سالمونلا تولید پرگنه بی رنگ می نمایند. بیشتر محیط های افتراقی ، محیط های انتخابی نیز هستند که شامل چندین فاکتور ممانعت کننده هم می باشند.

۵- محیط های غنی کننده : (Enrichement media)

این محیط ها حاوی ترکیباتی شیمیایی خاصی می باشند که تکثیر باکتری مورد نظر را افزایش داده و از رشد سایر باکتریها جلوگیری به عمل می آورند. مانند سلنیت . اِف (Selenit. F) و یا تتراتیونات سدیم که برای کشت سالمونلا در مدفوع مورد استفاده قرار می گیرند.

۶- محیط های انتقالی : (Transport media)

گاهی به علت طولانی شدن فاصله زمان نمونه گیری تا کشت لازم است نمونه را در یک محیط انتقالی که حاوی نمک و بافر است، قرار دهند و به آزمایشگاه بفرستند. در این محیط ها باکتریها رشد نکرده و در همان تعداد اولیه زنده می مانند.

عواملی که در تهیه محیط های کشت باید رعایت گردد

۱- **حلالیت** : محیط های تهیه شده باید کاملاً در آب حل شوند.

۲- **pH**: اغلب محیط های کشت pH مشابه مایعات بدن دارند. به همین منظور در زمان تهیه محیط ، pH را تنظیم می نمایند. ضمناً بافرهای فسفاته ، سیتراته و .... که در محیط های کشت وجوددارد، از تغییرات شدیدpH ناشی از رشد باکتریها در محیط کشت جلوگیری خواهد کرد.

۳- **استریل کردن** : پس از ساختن محیط های کشت ، به منظور از بین بردن میکروارگانیسمهای احتمالی ، بایستی آنها را استریل نمود. باید در نظر داشت که تمام ترکیبات محیط کشت در حرارت اتوکلاو پایدار مانده و تجزیه نشوند. اگر افزودن سرم ، قند و آنتی بیوتیک که نسبت به حرارت حساسند، الزامی است ، آنها را جداگانه با سایر روشهای فیزیکی استریل نموده و سپس در شرایط استریل به محیط کشت اضافه می کنند.

عواملی که پس از انتقال نمونه به محیط کشت باید رعایت گردد.

۱- **حرارت :** محیط های کشت را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در گرمخانه (انکوباتور Incubator) ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده ، تا باکتریها رشد کنند.

۲- **اکسیژن :** در جدا سازی میکروارگانیسم ها باید به نیازهای اتمسفریک آنها نیز توجه نمود. به طور مثال اگر جداسازی ارگانیسمی میکروآئروفیل مورد نظر است، باید فشار اکسیژن را کم یا محیط را در جار شمع دار (Candle Jar) حاوی ۱۰-۵ درصد گاز کربنیک ، قرار داد.

اگر منظور جداسازی باکتریهای بیهوازی باشد باید به نکات زیر توجه نمود:

افزودن مواد احیا کنندهٔ : مانند تیوگلیکولات سدیم و سیستئین به محیط کشت.

در این حالت می توان محیط کشت مایع را در شرایط هوازی انکوبه نمود، زیرا مواد احیا کننده، اکسیژن سطحی محیط را جذب و آنرا برای باکتری غیر قابل مصرف می سازد.

افزودن اسید پیروگالیک یا کربنات سدیم: این دو ماده نیز میزان اکسیژن محیط را کم و گاز کربنیک آن را افزایش می دهند.

استفاده از جار بی هوازی : (Anaerobic jar) متداولترین روش کشت بی هوازی استفاده از (Gaspak Jar) است که استوانه ای است پلاستیکی از جنس پلی کربنات که حاوی سبد توری با دانه های پالادیم و پوشش آلومینیومی به عنوان کاتالیزور است.

شرایط بی هوازی در جار با استفاده از یک ژنراتور مولد هیدروژن و دی اکسیدکربن و یا با تکنیک تخلیه و جایگزینی گازهای مورد نظر حاصل می شود. این ژنراتور شامل اسید سیتریک، بی کربنات

سدیم، سدیم بروهایدراید وکلراید کبالت است. پس از اضافه کردن آب با سرنگ یا پی پت به گازپک ، آنرا در داخل جار قرار می دهند و درب آنرا می بندند. با انجام واکنشهای زیرشرایط بی هوازی ایجاد می شود:

a) $C_6H_8O_7 + 3NaHCO_3 \rightarrow Na_3 (C_6H_5O_7) + 3H_2O+3CO_2$
b) $NaBH_4 + 2H_2O \rightarrow NaBO_2 + 4H_2$

CO_2 ایجاد شده در واکنش اول، رشد بی هوازی را تحریک می نماید. در حضور کاتالیست ، هیدروژن ایجاد شده در واکنش دوم، با اکسیژن موجود در جار تولید آب می نماید.

نمونه برداری:

اولین قدم در تشخیص آزمایشگاهی میکروارگانیسم های پاتوژن ، نمونه برداری صحیح است نمونه برداری و انتقال نامناسب ، گاه منجر به نتایجی گمراه کننده می گردد. به همین علت به اصولی در نمونه برداری اشاره می نماییم:

۱- نمونه بایستی قبل از تجویز آنتی بیوتیک گرفته شده و در صورت مصرف آنتی بیوتیک توسط بیمار، موضوع حتماً به آزمایشگاه اطلاع داده شود.
۲- نمونه حتی الامکان نباید با فلورنرمال مخلوط شود. به طور مثال نمونه بزاق در تشخیص پنومونی یا سواب از سطح یک زخم عمقی برای تشخیص یک عفونت بی هوازی و یا ترشحات بینی جهت تشخیص سینوزیت نمونه های مناسبی نیستند.
۳- در انتخاب نمونه نیز باید در نظر داشت که بیمار در چه مرحله ای از سیر بیماری است. به طور مثال در بیماران مبتلا به تب تیفوئید باکتری ابتدا در خون و بعد در مدفوع و در بیماران مبتلا به لیپتوسپیروز باکتری ابتدا در خون و در مراحل بعد در ادرار ظاهر می شود.
۴- از آنجا که تکرار آزمایش با مشکلاتی همراه است لذا می بایستی مقدار کافی نمونه برای آزمایش میکروسکوپی و کشت برداشت شود.

۵- گرفتن برخی نمونه ها توسط کارکنان آزمایشگاه و یا پرستار در بخش بلامانع است ، لکن نمونه هایی مانند مایع نخاع ، ترشحات پروستات ، ادرار به طریق آسپیراسیون سوپراپوبیک (Suprapubic aspiration) ، ترشحات سینوس و ... باید حتماً توسط خود پزشک گرفته شود.

روشهای نمونه برداری عبارتند از :

۱- انتقال مستقیم Direct passage

۲- نمونه گیری با سواب Swab

۳- اسپیراسیون با سرنگ Needle aspiration

۴- بیوپسی Biopsy

۱- انتقال مستقیم : در این روش آموزش صحیح بیمار توسط کارکنان آزمایشگاه ، پزشک یا پرستار از اهمیت ویژه ای برخوردار است. مانند نمونه گیری ادرار که به بیمار آموزش داده می شود پس از ضد عفونی کردن بخش خارجی دستگاه ادرار- تناسلی، ادرار را در ظرف استریل جمع آوری نماید.

۲- نمونه گیری با سواب : مانند برداشت از ترشحات حلق ، ترشحات زخمهای سطحی ، ترشحات واژینال ، ترشحات مجزا و ... این نمونه ها معمولاً توسط پرسنل آزمایشگاه ، پزشک یا پرستار گرفته می شود. نمونه گیری باید به گونه ای باشد که آلودگی با فلور نرمال به حداقل برسد. بطور مثال برای برداشت از ترشح حلق سواب نباید با مخاط دهان تماس پیدا کند و در ترشحات زخمهای سطحی ، ابتدا محل را با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده و بعد از ترشحات خارج شده از زخم ، برداشت صورت می گیرد.

۳- آسپیراسیون با سرنگ : مانند برداشت از چرک آبسه ، زخمهای عمقی ، ترشحات سینوس، نمونه های اسپیراسیون Transtracheal aspiration یا موارد دیگری که در حین جراحی گرفته می شود . این نمونه ها توسط پزشک و غالباً در اطاق عمل گرفته می شود. به علت احتمال وجود باکتریهای بی هوازی در این نمونه ها، پس از برداشت باید هوای داخل سرنگ را کاملاً تخلیه کرد. در صورتی که ارسال سریع امکانپذیر باشد، سرسوزنرا با چوب پنبه مسدود نموده و در غیر این صورت نمونه را در محیط انتقالی بی هوازی ریخته و به آزمایشگاه ارسال می نمایند.

۴- **بیوپسی :** مانند نمونه برداری از زخمهای عمقی، استئومیلیت، آپاندیسیتهای پرفره و گانگرنه و .... این نمونه ها نیز به علت احتمال وجود باکتریهای بی هوازی ، باید در شرایط فقدان اکسیژن به آزمایشگاه ارسال گردند.

جلسه پنجم: کشت باکتریها

دستور کار :

۱- برداشت ازمحیط کشت جامد و کشت در محیط جامد شیب دار(slant culture)

۲- برداشت از محیط کشت جامد و کشت در محیط آبگوشت مایع (broth)

۳- برداشت از محلول میکروبی و کشت برروی پلیت به روش ایزولاسیون

برای شناسایی و تشخیص باکتریها لازم است آنها را در محیط غذایی مناسب کشت دهیم و نظر به اینکه نیازمندیهای غذایی و شرایط زیستی آنها با یکدیگر متفاوت می باشد، یک نوع محیط کشت برای تمام باکتریها مناسب نیست و باید همیشه مواد مورد نیاز آنها را در نظر گرفت. کشت باکتری در موارد زیر ضروری است:

۱- چون باکتریها از نظر مرفولوژی (آزمایش میکروسکوپی) قابل تشخیص از یکدیگر نیستند، لذا به منظور به دست آوردن پرگنه خالص باکتریها، اغلب نمونه های بالینی را کشت و سپس با آزمایشهای بیوشیمیایی و سرولوژیکی ، باکتریها را به طور دقیق شناسایی می نمایند.

۲- به منظور درمان بیماریهای عفونی و تجویز داروی مناسب پس از تعیین هویت عامل بیماریزا باید مقاومت و حساسیت آن را نسبت به داروهای ضد میکروبی تعیین نمود.

۳- در آزمایشهای سرمی برای تشخیص بیماریهای عفونی ، احتیاج به آنتی ژن داریم. به همین دلیل برای تهیه آن باید میکروب را کشت داد و از آن آنتی ژن تهیه نمود.

۴- برای تهیه واکسن و سرم از باکتریها نیز ابتدا باید آنها را کشت داد.

۵- یکی دیگر از مواد کشت باکتریها، تهیه آنتی بیوتیک و دیگر فرآورده های بیولوژیک است. برای جلوگیری از آلوده شدن محیط کشت با میکروبهای موجود در هوا باید کشت در کنار شعله و در هود باکتریولوژی و یا در محلی انجام شود که جریان هوا وجود نداشته باشد. میز کار باید عاری از گرد و غبار بوده و هنگام کشت از حرف زدن و تردد خوداری شود.

وسایل مورد نیاز:

الف – ابزار برداشت　　ب – محیط کشت

ج – شعله　　د – گرم خانه یا انکوباتور

الف- ابزار برداشت

در میکروبشناسی براساس اینکه برداشت از چه محلی انجام شود از ابزار بخصوص استفاده می شود، از جمله :

۱- میله پلاتین (آنس)

میله پلاتین از سه قسمت تشکیل شده است، قسمت انتهایی به طول تقریبی ۶/۵cm از جنس پلاتین که یک طرف آن در دسته آلومینیومی قرار دارد (روی قسمتی که در دست قرار می گیرد، برای جلوگیری از انتقال حرارت از عایق استفاده می شود.) نظر به بالا بودن قیمت پلاتین ، گاه بجای آن از آلیاژهای دیگری مانند نیکروم (Nichrome) استفاده می نمایند. انتهای پلاتین ممکن است به دو صورت باشد:

الف) به صورت حلقه مدور کاملاً بسته که قطر داخلی آن در حدود ۴-۲ میلی متر است.

با این حلقه می توان مقداری مواد جامد یا قطره ای از مواد مایع را برداشت کرد. نظر به اینکه انتهای سیم به شکل حلقه است به میله پلاتین ، لوپ Loop هم گفته می شود.

ب) راست و بدون انحناء که از این نوع برای کشت عمقی و برداشت از کلنی های مجزا و در مواردی که مقدار کم میکروب مورد نیاز است، استفاده می شود.

۲- سواب :

سیم یا چوب باریکی است که به انتهای آن پنبه هیدروفیل پیچیده شده است وپس از استریل کردن جهت برداشت، از آن استفاده می نمایند. پس از پایان کار انتهای سواب را سوزانده و در ظرف محتوی مادهٔ ضد عفونی می اندازند.

۳- پی پت پاستور:

ابتدا لوله شیشه ای به قطر 5mm و طول ۲۰cm تهیه می کنند و سپس دو انتهای آن را روی شعله با حرارت صاف نموده، دو سرآن را پنبه گذارده و در ظرف استوانه ای قرار داده و یا در کاغذ پیچیده و استریل می نمایند. در موقع لزوم وسط لوله را در بالای شعله نگه اشتهو می چرخانند تا شیشه کاملاً نرم شود. سپس دو انتهای لوله را کشیده ، تا وسط لوله به صورت بسیار باریک درآید. بعد لوله را از وسط جدا کرده و انتهای پی پتها را به وسیله شعله بسته و به این ترتیب دو پی پت استریل به دست می آید. در موقع کار انتهای نازک هر یک از پی پت ها را شکسته و بوسیله عبور دادن از روی حرارت، قسمت خارجی پی پت را استریل می کنند و برای برداشت از محیط های مایع مورد استفاده قرار می دهند. باید دقت نمود پس از پایان کار، پی پت را در محلول ضد عفونی کننده قرار داد.

ب – محیط کشت : نحوه استفاده از محیط های کشت مایع و جامد در صفحات بعد آمده است.

ج – شعله : با توجه به آلودگیهای احتمالی هنگام برداشت یا کشت، توصیه می شود کار در شعاع ۱۵-۱۰ سانتیمتری شعله انجام شود.

د- گرمخانه (انکوباتور یا اتوو) (Incubator, Etuve)

محیط کشت شده را باید در شرایط مناسب از نظر درجه حرارت ، رطوبت و فشار اکسیژن قرار داد تا رشد بخوبی انجام شود. نظر به اینکه درجه حرارت مناسب برای باکتریهای بیماری زای انسان ۳۵c̊ -۳۸c̊ است، از دستگاهی به نام گرمخانه یا اتوو که معمولاً بوسیلهٔ یک منبع حرارتی ، گرم می شود، استفاده می نمایند. این دستگاه دارای ترموستات جهت تنظیم حرارت می باشد که با قطع و وصل کردن جریان برق، درجه حرارت را ثابت نگاه می دارد. در بعضی موارد لازم است محیط کشت میکروب را در حرارت ۲۲c̊ یا درجات دیگر گرمخانه قرار داد. ضمناً هنگام انکوباسیون باید نیازهای اتسمفریک باکتریها را در نظر داشت.

روشهای کشت

بطور کلی برداشت از محیط مایع، جامد یا بیمار می باشد و کشت نیز در محیط مایع یا جامد صورت می گیرد.

کشت در محیط جامد داخل لوله

الف – کشت در محیط جامد شیب دار (Slant Culture)

کشت در لوله معمولاً زمانی صورت می گیرد که نگهداری کشت خالص باکتری مورد نظر باشد، قبل از کشت

باید کلیه وسایل مورد لزوم را آماده کرد و پنبه را امتحان نمود که به جدار لوله نچسبیده باشد. اگر پنبه به جدار لوله چسبیده بود پنبه را بوسیله انگشت کوچک وکف دست گرفته ، لوله را می چرخانیم تا پنبه جدا گردد. برای کشت ابتدا میله پلاتین را مانند مداد در دست راست گرفته و آن را به این طریق استریل می نماییم:

قسمت پلاتینی آن را برروی شعله گرفته تا سرخ شود و سپس دسته فلزی آن را چند بار از روی شعله عبور می دهیم. هنگام برداشت از لوله ، با سرانگشتان دست چپ ، پایین لوله را به طور مایل گرفته، پنبه یا درب لوله را با انگشت کوچک دست راست و کف دست برمی دارند. به این ترتیب که انگشت کوچک دست راست را روی کف دست حلقه کرده پنبه را از دهانه لوله برمی دارند. (این روش مخصوص افراد راست دست می باشد.) پس از برداشتن پنبه باید بلافاصله دهانه لوله را از روی شعله عبور داده تا هوای درون آن گرم و از نفوذ هوای آلوده جلوگیری گردد. آنگاه حلقه پلاتین را که استریل و سرد شده است داخل لوله می نمایند. بوسیله حلقه پلاتین کمی از میکروب سطح محیط را برداشت و آن را از لوله خارج می نمایند. مجدداً دهانهٔ لوله را از روی شعله عبور داده و پس از آن که پنبه آن را در دهانهٔ لوله گذاردند، لوله کشت را در محل خود قرار می دهند. باکتری برداشت شده رابلافاصله در محیط مورد نظر به طریق فوق کشت می دهند.

به این منظور مانند روش برداشت عمل نموده و میله پلاتین را کـه حـاوی بـاکتری اسـت وارد لولـه کرده و از یک سانتیمتری انتهای لوله تا بالا خطوط مارپیچی برروی تمـام سـطح ژلـوز ترسـیم مـی نمایند، بطوری که سطح ژلوز کنده نشود. سپس بلافاصله سرلوله را از روی شـعله عبـور داده و پنبـه آن را می گذارند. (شکل شماره ۳) حلقه پلاتین را استریل و در محل خود قرار می دهند.

هنگامی که حلقه پلاتین آلوده به باکتری است، نباید مستقیماً در شعله قرار گیـرد. بلکـه بایـد آن را تدریجاً به شعله چراغ نزدیک کرد و سپس در داخل شعله نگه داشـت تـا سـرح شـود. در غیـر ایـن صورت مواد آلوده ای که هنوز کاملاً استریل نشده اند، ممکن است به اطراف پراکنـده شـود. محـیط کشت را در انکوباتور گذاشته و پس از زمان انکوباسیون نتیجه را بررسی می کنند.

ب) کشت به روش عمقی در محیط جامد ایستاده و شیب دار در لوله

برای کشت در این محیط ها میله پلاتین را به صورت نیزه ای در آورده، آنرا به بـاکتری آغشـته مـی کنند. سپس آن را در عمق محیط کشت فرو برده و خارج می سـازند. و در محـیط هـای شـیب دار پس از خارج نمودن میله از عمق لوله، روی سطح نیز به صورت خطوط مارپیچی کشـت خواهدشـد. (شکل شماره ۴).

کشت در محیط مایع

اگر بخواهند در محیط مایع کشت دهند، حلقه پلاتین را اسـتریل و آن را بـه بـاکتری آلـوده نمـوده سپس سرپوش لوله را برداشته و پس از حرارت دادن سرلوله ، آن را کج کرده ، بـاکتری را بـه جـدار لوله می سایند و پس از آن لوله را راست کرده، تا با باکتریها وارد محیط گردند و بعد حلقـه پلاتـین را می سوزانند. اگر نمونه، مایع باشد یک حلقه پراز مایع را برداشت و در محیط مایع جدید وارد مـی کنند.

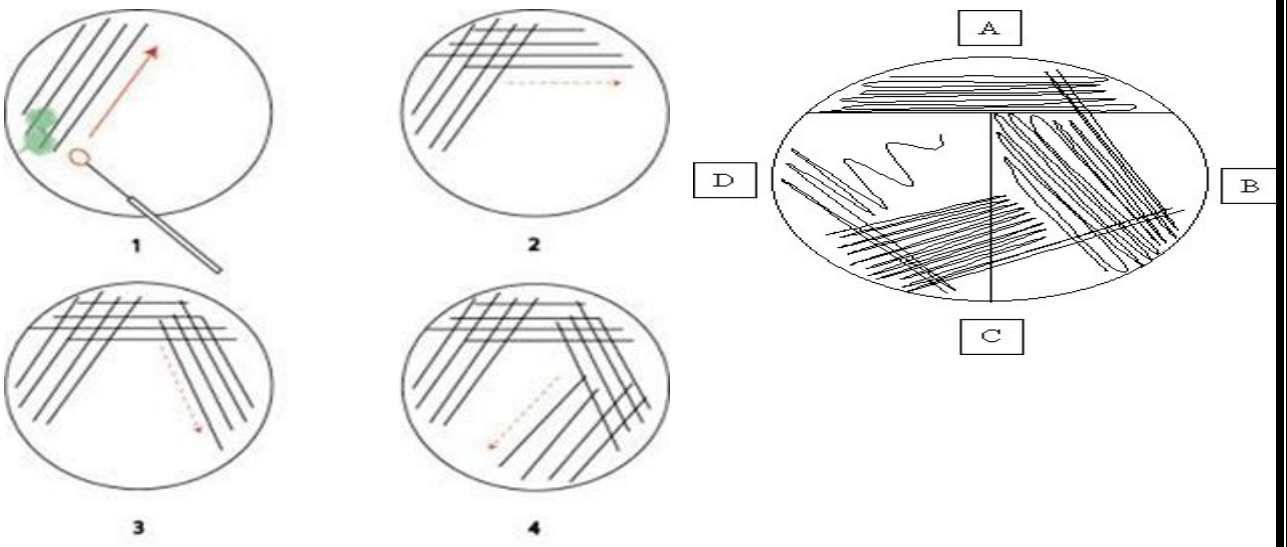
کشت به روش ایزولاسیون (جدا کردن باکتریها)

در نمونه های جمع آوری شده از بیمار، غالباً بیش از یک نوع باکتری وجود دارد. روی این اصل باید آنها را به طریقی کشت داد که پرگنه مجزا به دست آید و با برداشت از پرگنه خالص، خصوصیات حیاتی آنها را مطالعه نمود. برای انجام این روش از پلیت (Petridish یا Plate) استفاده می نمایند. (در اینجا نیز ممکن است برداشت از محیط مایع و یا جامد باشد).

برداشت از محیط مایع و جامد

ابتدا مطابق شکل شماره (۶ و۵) ، حلقه پلاتین ر استریل نموده و سپس لوله حاوی محلول باکتری را به آرامی تکان می دهند و مطابق روش قبل، سرلوله را حرارت داده و آنگاه لوپ را وارد محیط مایع می کنند. دو حلقه از آن برداشت کرده و در یک گوشه از پلیت قرار داده و با حلقه پلاتین و زاویه ۴۵° به صورت خطوط رفت و برگشت و فشرده $\frac{۱}{۳}$ پلیت نمونه را پخش می نمایند. (مرحله A) . سپس پلیت را کمی در دست چرخانده و با نوک حلقه پلاتین ، خطوطی موازی هم رسم می کنند. به طوری که تماس این خطوط با خطوط مرحله A به تدریج کم شود مرحله (B) این عمل را دو بار دیگر تکرار می کنند مراحل (مراحل C وD) . لازم به تذکر است که خطوط مرحله آخر(D) با مرحله اول (A) تماس پیدا نکند.

در نتیجه به تدریج تعداد باکتریها در قسمتهای آخر به قدری کم می شود که پس از انکوباسیون پرگنه های مجزا و مشخص به دست می آید که پس از برداشت ازآنها، می توان خصوصیات شان را مطالعه نمود. در صورتی که از محیط جامد برداشت کنند به علت اینکه تراکم باکتری بیشتر است بعد از انجام مرحل (A) لوپ را برروی شعله استریل کرده و پس از سرد شدن مطابق مراحل قبل کار را ادامه می دهند. حلقه پلاتین را پس از استفاده باید مجدداً استریل کرده و در جای خود قرار داد.



جلسه ششم: استافیلوکوک، میکروکوک و آنتی بیوگرام

دستور کار :

۱- مطالعه پیگمانهای استافیلوکوک

۲- کشت استافیلوکوک برروی محیط شاپمن (مانیتول سالت آگار)

۳- انجام تست کواگولاز

۴- مطالعه تست دی ان آز

۵- مطالعه تست حساسیت به باسیتراسین جهت تشخیص میکروکوک از استافیلوکوک

۶- آزمایش میکروسکوپی استافیلوکوک پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی گرم

۷- مطالعه استافیلوکوک (گسترش تهیه شده از چرک)

۸- انجام تست آنتی بیوگرام .

خصوصیات استافیلوکوک :

باکتریهایی هستند گرم مثبت ، کروی شکل به قطر یک میکرون که مانند خوشهٔ انگور، پهلوی یکدیگر قرار می گیرند. این خوشه ها در محیط کشت جامد بزرگتر و در محیط مایع کوچکترند. در

چرک ، تک تک ، دوبدو ، چهارتایی و گاه مانند خوشه های کوچک پهلوی یکدیگر قرار می گیند. این باکتریها اکثراً بدون کپسول، بی حرکت و بدون اسپور هستند. کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی هستند.

برخی از استافیلوکوکها بیماری زا، عده ای کمانسال و برخی ساپروفیت هستند. جنس استافیلوکوک به بیش از ۲۰ نوع تقسیم می شود که استافیلوکوک طلایی (St. aurous) ، اپیدرمیدیس (St. epidermidis) و ساپرفیتیکوس (St.saprophyticus) مهمترین انواع انسانی محسوب می شوند. قدرت بیماریزایی استافیلوکوک طلایی از انواع دیگر بیشتر است. جهت تشخیص افتراقی سه نوع به جدول زیر مراجعه شود.

	Pigment	Coagulase	DNase	Urease	Alkaline Phosphatase	NB[7]	PMB[8]
St.aureus	+	+	+	d	+	-	-
St.epidemidis	-	-	-	+	+	-	-
St.saprophyticus	d	-	-	+	-	+	+

اساس و روش کار :

۱- مطالعه پیگمانهای استافیلوکوکها

استافیلوکوکها روی محیط های کشت جامد پیگمانهای طلایی ، لیمویی و سفید ایجاد می کنند. تولید پیگمان به شرایط محیط بستگی دارد. بطور مثال د مجاورت هوا، حرارت ۲۲c°، وجود شیر در محیط کشت ، پیگمان بهتر تشکیل می شود.

۲- بررسی تخمیر قند مانیتول

[7] - NB: Resistance to Novobiocin
[8] - PMB: Resistance to (Polymixin B.)

از یک نوع استافیلوکوک برداشت و در روی محیط شاپمن به صورت خطوط زیگزاگ کشت دهید.

* محیط شاپمن یا مانیتول سالت آگار (Manitol salt agar)

این محیط ژلوز معمولی است که به نسبت یک درصد قند مانیتول ، ۷/۵ درصد کلرور سدیم و فنل رد به عنوان معرف به آن اضافه شده است. pH محیط ۷/۴ و رنگ محیط قرمز است . در صورت تخمیر قند مانیتول ، pH محیط اسیدی شده و رنگ محیط زرد می شود.

۳- تست کواگولاز Coagulase test

استافیلوکوکهای بیماریزا، آنزیمی به نام کواگولاز آزاد (Free coagulase) ترشح می کنند که با ترکیبی در پلاسما به نام (Coagulase Reacting Factor) واکنش نموده و کمپلکس Coagulase-CRF eomplex را ایجاد می نماید. این ماده از ترومبین غیر قابل تشخیص است و روی فیبرینوژن اثر کرده و آن را به فیبرین تبدیل می نماید.

روش کار :

به منظور انجام این آزمایش به ۰/۵ سی سی پلاسمای خون خرگوش (EDTA) که به نسبت $\frac{۱}{۵}$ رقیق گردیده است ،۰/۱ سی سی از کشت ۲۴ ساعته استافیلوکوک در آبگوشت را اضافه کرده و یا یک لوپ پراز کلونی روی ژلوز را برداشت کرده، با پلاسما مخلوط می نماییم و سپس در حرات ۳۷c° قرار می دهیم. اگر استافیلوکوک کواگولاز مثبت باشد در عرض۱ تا ۴ ساعت پلاسما را منعقد می نماید و لخته تشکیل می شود. در غیر این صورت پلاسما منعقد نمی شود. در صورت منفی بودن تست، پس از ۴ ساعت انکوباسیون، لوله ها را یک شبانه روز در درجه حرارت اطاق قرار داده و سپس نتیجه را بررسی می نماییم.

استافیلوکوک اورئوس	کواگولاز مثبت
استافیلوکوک اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس	کواگولاز منفی

۴- آزمایش دی ان آزDNAse

این تست به منظور بررسی فعالیت آنزیم DNAse است .

اساس و روش کار :

این تست با روشهای مختلفی چون رسوب با اسیدکلریدریک ، تولوئیدین بلو و متیل گرین انجام می شود که در این جا به روش رسوب با اسید کلریدریک اشاره می گردد.

DNA سالم و دست نخورده در اسید کلریدریک نرمال نامحلول است . در حالیکه اولیگونوکلئوتیدهای آزاد شده به علت فعالیت دی ان آز، در اسید مزبور محلولند. باکتری را روی محیط دی ان آز کشت داده و پس از زمان انکوباسیون برروی آن اسید کلریدریک نرمال می ریزیم.

اگر DNA تجزیه نشده باشد رسوب کرده و به صورت منطقه کدری مشاهده می شود. در حالیکه اولیگونوکلئوتیدها در اسید حل شده و هاله ای شفاف در اطراف منطقهٔ رشد ایجاد می کنند. در حدود ۱۸ درصد از استافیلوکوکهای کواگولاز منفی نیز این آنزیم را دارا می باشند.

۵- مطالعه تست حساسیت به باسیتراسین جهت تشخیص میکروکوک از استافیلوکوک

تشخیص میکروکوک از استافیلوکوک مطابق جدول شماره ۲ صورت می گیرد. در این جا تنها، حساسیت به باسیتراسین مطرح می شود

جدول شماره ۲ : اختلاف بین جنس میکروکوک و استافیلوکوک

Test	Micrococcus	Staphylococcus
Resistant to lysostaphin	+	-
Modified oxidase & benzidine	+	-

Resistant bo bacitracin (0.04U)	-	+

روش کار :

باکتری را در محیط آبگوشت کشت داده و بوسیله سواب استریل ، نمونه را در سطح ژلوز ساده (مولر هینتون آگار) پخش نموده و سپس با پنس یک دیسک با سیتراسین 0.04 واحدی را روی منطقهٔ کشت، قرار می دهیم. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط را بررسی می نماییم . در صورت حساسیت به دیسک باسیتراسین، هاله عدم رشد (Inhibition zone) در اطراف آن دیده می شود.

استافیلوکوکها نسبت به این دیسک مقاومند.

میکروکوکها نسبت به این دیسک حساسند (وجود هاله عدم رشد)

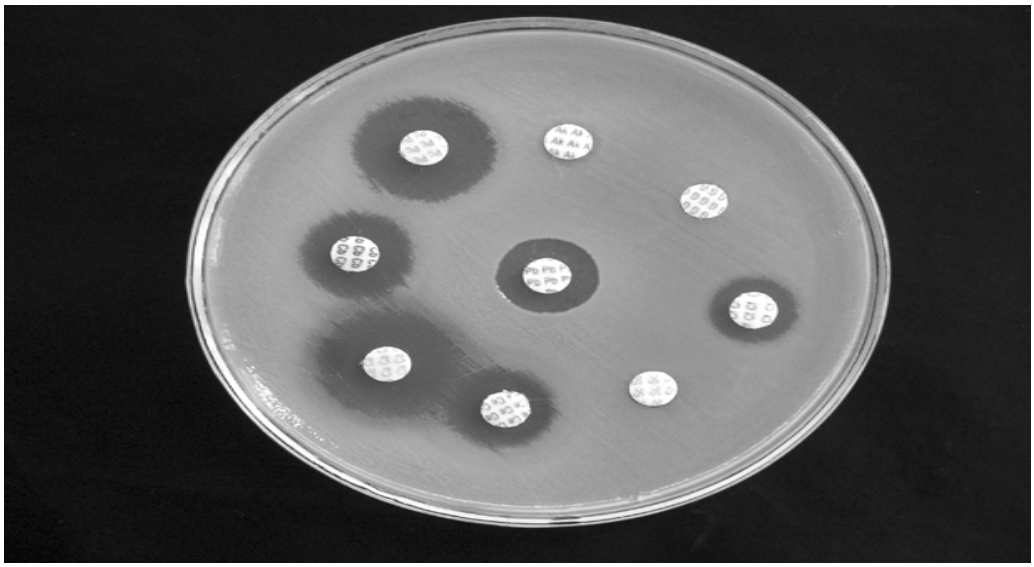
۶- آنتی بیوگرام (Antibiogram)

تعیین حساسیت یا مقاومت میکروبها نسبت به مواد ضد میکروبی را آنتی بیوگرام گویند. برای انجام آنتی بیوگرام روشهای متعددی وجود دارد که ساده ترین آنها روش دیسک آگار دیفیوژن Disk agar diffusion است که در تمام آزمایشگاهها برای تعیین حساسیت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک انجام می شود.

روش کار به این طریق است که یک سواب پنبه ای استریل را داخل سوسپانسیون میکروبی خالص که حاوی $۱۰^۵ - ۱۰^۶$ CFU/ml (CFU: Colony Forming unit) باکتری باشد[۹] فرو برده و پس از آن به جدار داخلی لوله فشار داده و آن را از لوله خارج می کنند و سپس سواب را به سطح محیط کشت تماس می دهند تا اینکه تمام سطح محیط آغشته به میکروب گردد. البته روش استاندارد این است که مقدار معینی از سوسپانسیون میکروبی را در داخل پلیت ریخته و حرکت می دهند به

[۹] - برای تعیین کدورت سوسپانسیون از استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده می شود.

طوریکه در تمام سطح به طور یکنواخت پخش شود. سپس پلیت های کشت شده را به مدت ۲ تا ۵ دقیقه بی حرکت می گذارند تا رطوبت آنها جذب شود و دیسکهای کاغذی را که با عوامل ضد میکروبی به غلظتهای مختلف آغشته شده است به دقت روی سطح محیط جامد داخل پلیت قرار می دهند. پلیت را به مدت ۱۸ تا ۲۴ساعت در گرمخانه ۳۵c° قرار داده و نتیجه را بررسی می نمایند. قطر هاله عدم رشد را با خط کش اندازه گیری و با جداول صفحه بعد مقایسه و نتایج رابه صورت حساس (Sensitive: S) ، نیمه حساس (Intermediate:I) یا مقاوم (Resistant: R) گزارش می نمایند.



جلسهٔ هفتم: استرپتوکوک و پنوموکوک

دستور کار:

۱- آزمایش میکروسکوپی استرپتوکوک در کشت پس از رنگ آمیزی به روش گرم .

۲- آزمایش میکروسکوپی پنوموکوک در نسج پس از رنگ آمیزی به روش گرم.

۳- آزمایش میکروسکوپی استرپتوکوک در گسترش تهیه شده از چرک

۴- مشاهده انواع همولیز برروی ژلوز خوندار

۵- مطالعه حساسیت به دیسک باسیتراسین جهت تشخیص استرپتوکوکهای β - همولیتیک گروه A

۶- مطالعه حساسیت به دیسک اپتوکین جهت تشخیص پنوموکوک از سایراسترپتوکوکهای α - همولیتیک

۷- مشاهده آزمایش کمپ جهت تشخیص استرپتوکوک گروه B

۸- مشاهده آزمایش کاتالاز

۹- بررسی نتایج آزمایش آنتی بیوگرام

خصوصیات استرپتوکوکها

باکتریهایی هستند به شکل گرد یا بیضی به قطر یک میکرومتر که شبیه زنجیره دنبال یکدیگر قرار می گیرند. این باکتریها گرم مثبت، بی حرکت و بدون اسپور می باشند. برخی از آنها در کشت تازه دارای کپسول نازکی از جنس اسید هیالورونیک هستند. با باکتریها کاتالاز منفی بوده و از روی این خاصیت آنها را از میکروکوکاسیه تشخیص می دهند. استرپتوکوکها را از روی خاصیت همولیز به سه گروه تقسیم می نمایند:

۱- استرپتوکوکهای بتاهمولیتیک

در اطراف پرگنه این باکتریها در روی ژلوز خون دار هاله ای بی رنگ تشکیل می شود، که آنرا همولیز کامل یا همولیز β می نامند. برای مشاهدهٔ همولیز ناشی از استرپتولیزین O، در انتهای ایزولاسیون لوپ را به طور عمودی وارد ژلوز می کنند.

۲- استرپتوکوکهای α همولیتیک

در اطراف پرگنـــه این باکتریها برروی ژلوز خوندار هاله ای سبز رنگ که همولیز ناقص یـا α اسـت، مشاهده می گردد.

۳- استرپتوکوکهای غیر همولیتیک (واکنش گاما)

که برروی ژلوز خوندار همولیز تولید نمی کند.

اکثر عفونتهای استرپتوکوکی در انسان بوسیله استرپتوکوکهای β همولیتیـک گـروه A ایجـاد مـی گردد خانم ربکالانسفیلد استرپتوکوکهای بتاهمولیتیـک را از روی کربوهیـدرات آنتـی ژن Cell wall به گروههای سرولوژیکی A تا Q تقسیم بندی نمود که امروز بر تعداد آنها اضافه گردیده است.

اکر نمونه هایی که در انسان تولید بیماری می نمایند، استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A می باشـد علاوه بر گـروه A گروههـای C,G,L,M,D و B و اسـترپتوکوک پنومونیـه و اسـترپتوکوکهای گـروه ویریدانس نیز برای انسان بیمـاریزا مـی باشـند. اسـترپتوکوکهای بتاهمولیتیـک گـروه A را از روی پروتئین M سطحی باکتری به بیش از ۸۰ سروتیپ تقسیم نموده اند که براسـاس اعـداد نامگـذاری شده است.

آزمایش تعیین حساسیت نسبت به باسیتراسین :

برای تشخیص افتراقی استرپتوکوک β همولیتیک گروه A از سـایر اسـترپتوکوکهای بتاهمولیتیـک سـاده تـرین روش، تعیـین حساسـیت آن نسـبت بـه دیسـک باسیتراسـین مـی باشـد. ۹۵٪ از استرپتوکوکهای گروه A نسبت به دیسک باسیتراسین ۰/۰۴ واحدی، حساسیت نشان می دهنـد، در صورتی که سایر استرپتوکوکها نسبت به آن مقاومت دارند. در تعیین حساسیت، اندازه قطر هالۀ عدم رشد موثر نیست.

آزمایش L-pyrolidonyul-3 naphthylamide hydrolysis :

استرپتوکوک پیوژن گروه A، بعضی از انواع انتروکوک و برخی استافیلوکوکها قادر به هیدرولیز پیرولیدونیل نفتیل آمید بوسیله آنزیم ال – پیروگلوتامیل آمینوپپتیداز (L-pyroglutamyl aminopeptidase) می باشند.

در سطح کاغذ صافی که آغشته به پیرولیدونیل بتانفتیل آمید باشد، مقداری از کلونی باکتری مورد آزمایش را قرار می دهیم، سپس یک قطره معرف ان – ان دی متیل سینامالدئید اضافه می نماییم . در صورت مثبت بودن در مدت ۵ دقیقه رنگ قرمز ایجاد می شود. در موارد منفی تغییر رنگ حاصل نمی گردد و یا رنگ نارنجی بوجود می آید.

خصوصیات پنوموکوک

بسیاری از صفات پنوموکوکها شبیه استرپتوکوکهای ویریدانس می باشد. باکتریهایی هستند بیضی شکل، به قطر یک میکرومتر شبیه به سر نیزه یا شعله شمع که معمولاً طوری دوبدو پهلوی یکدیگر قرار می گیرند که دو انتهای پهن آنها مجاور یکدیگر واقع می شود. گاهی نیز دو یا سه جفت آنها دنبال یکدیگر قرار گرفته و زنجیر کوتاهی را تشکیل می دهد که ممکن است با استرپتوکوک ویریدانس اشتباه شود. این باکتریها غیر متحرک بوده و اسپور تولید نمی نمایند. سویه های بیماری زا در بدن انسان و محیط کشت مناسب، کپسولی از جنس پلی ساکارید ایجاد می نمایند و از این نظر به بیش از ۱۰۰ تیپ تقسیم شده اند. این باکتریها گرم مثبت بوده و در رنگ آمیزی گرم، کپسول به شکل هاله روشنی در اطراف باکتری مشاهده می شود. در زنگ آمیزی اختصاصی کپسول ، هاله بهتر دیده می شود.

بوسیله آزمایش تورم کپسولی (Quelling test) می توان تیپهای مختلف باکتری را تشخیص داد . چون پنوموکوک و استرپتوکوکهای ویریدانس ، هر دو در روی محیط کشت ژلوز خوندار، همولیز آلفا ایجاد می نمایند و ممکن است با هم اشتباه گردند، از خصوصیات زیر برای تشخیص پنوموکوک

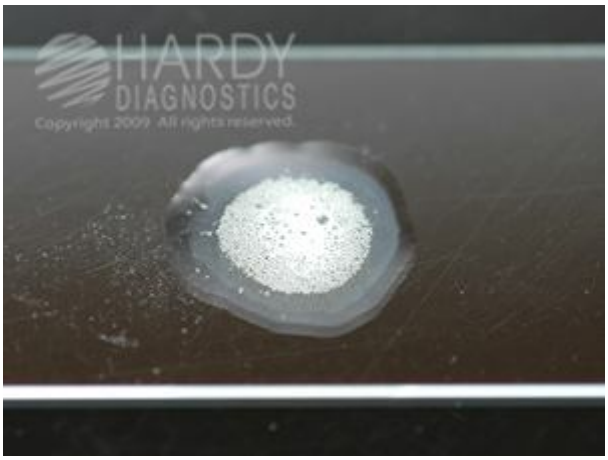
استفاده می شود. پنوموکوکها در املاح صفراوی حل می شوند، اینولین را تخمیر می کنند و نسبت به اپتوکین حساسیت دارند. موش سفید (سوری) نسبت به پنوموکوک بسیار حساس بوده و پس از تزریق ۱۸ تا ۲۴ ساعت می میرد و می توان پنوموکوک را از احشاء مختلف موش بطور خالص بدست آورد.

آزمایش حساسیت نسبت به اپتوچین (Optochin)

یک دیسک اپتوکین را روی سطح ژلوز خوندار که قبلاً روی آن باکتری را کشت داده، می گذارند و بعد از زمان انکوباسیون حساسیت آن را بررسی می نمایند. (هاله عدم رشد باید قطری برابر ۱۴ میلی متر یا بیشتر داشته باشد).

آزمایش کاتالاز:

یک قطره آب اکسیژنه ۳٪ را روی لام قرار داده و از کلونی باکتری برداشت و در آب اکسیژنه حل می کنیم. در صورتی که باکتری واجد آنزیم کاتالاز باشد، آب اکسیژنه را تجزیه می کند و حبابهای اکسیژن متصاعد می شود(برای تمایز استافیلوکوک از استرپتوکوک می توان از تست کاتالاز استفاده کرد).



کاتالاز منفی کاتالاز مثبت

آزمایش کمپ : (CAMP test)

(CAMP test = Christie Atkins Monch-Peterson test)

برای تشخیص احتمالی استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه B، از این آزمایش استفاده می شود . فاکتور کمپ ، ماده ای پروتئینی ، خارج سلولی و مقاوم به حرارت است که استرپتوکوکهای گروه B تولید می کنند که با بتاتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس به صورت سینرژیسم عمل کرده و موجب تشدید همولیز سریع گلبولهای قرمز گوسفند یا گاو می شود.

برای این تست از استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 استفاده می شود.

روش کار : سویه استافیلوکوکوس اورئوس مولد بتا توکسین را به صورت خط مستقیم در روی ژلـوز خوندار (خون گوسفند) کشت داده ، سپس با دقت ارگانیزم مورد نظر را به طول ۳-۲ سـانتی متـر و عمود بر خط کشت استافیلوکوکوس ، کشت می دهند بطوریکه آنرا قطع نکند. لازم بـه تـذکر اسـت که کنترل مثبت و منفی را نیز کشت می دهند.

بعد از انکوباسیون ۱۸ ساعته در ۳۵c° و در شرایط هوازی، تست را بررسی می کنند اسـترپتوکوکهای گروه B همولیز شدید به شکل پیکان ایجاد می کنند.

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه B (استرپتوکوک آگالاکیته) + همولیز پیکان شکل

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A (استرپتوکوک پیوژن) + همولیز

جلسه هشتم: نایسریا و ترپونم

دستور کار :

۱- مطالعه میکروسکوپی گونوکوک در چرک (رنگ آمیزی گرم و ساده)

۲- رنگ آمیزی نایسریا در کشت به روش گرم.

۳- رنگ آمیزی فونتانا و آزمایش میکروسکوپی ترپونم پالیدوم

۴- مشاهده و تخمیر قند مالتوز و گلوکز در محیط CTA

۵- مشاهده تست اکسیداز

خصوصیات نایسریا:

نایسریا دیپلوکوکهایی گرم منفی به ابعاد ۰/۸ میکرومتر می باشند، شبیه دانهٔ لوبیا یا قهوه که معمولاً دو به دو روبروی هم قرار می گیرند و تقعر آنها در مقابل یکدیگر است. این باکتریها، بی حرکت ، بدون اسپور و هوازی بوده ولی می توانند در شرایط میکروآئروفیلیک نیز تکثیر نمایند. در جنس نایسریا دو گونه بیماری زا مشاهده می شود: نایسریا منتژی تیدیس N.meningitidis یا منگوکوک که ایجاد منتژیت چرکی می کند و دیگری نایسریا گونورئه آN.gonorrheae که گونوکوک نیز نامیده میشود و عامل بیماری سوزاک در انسان می باشد. منگوکوک اغلب دارای کپسول بوده، ولی در گونوکوک کپسول واضحی دیده نمی شود. گونوکوک در مردها تولید اورتریت حاد نموده و پس از آن به بافتهای اورتر، پروستات ، مثانه ، وزیکول سمینال، اپیدیدیم و بیضه سرایت می کند. در زنها بیماری سوزاک از اورتر و گردن رحم شروع می شود و ممکن است باعث التهاب گردن رحم و اطراف آن، لوله ها ، تخمدانها و حتی پرده صفاق گردد. در نوزادان ورم ملتحمه چرکی ایجاد می کند.

تشخیص آزمایشگاهی سوزاک

۱- آزمایش مستقیم :

در ابتدای بیماری، در خانمها از گردن رحم ، ترشح مجرا و مقعد و در آقایان از ترشحات مجرا و در ورم ملتحمه چرکی از ترشحات ملتحمهٔ چشم گسترش تهیه و به روش گرم و ساده رنگ آمیزی می نمایند و به

جستجوی دیپلوکوکهای گرم منفی می پردازند. در آزمایش میکروسکوپی ، دیپلوکوکهای شبیه دانه لوبیا یا قهوه که سطح تقعرشان روبروی هم می باشد مشاهده می گردند. در دورهٔ حاد باکتریها اکثراً داخل لکوسیت هستند و پس از مدتی در خارج و در داخل سلول مشاهده می گردند. در مراحل مزمن گاه باکتری های ثانوی از قبیل کلی باسیل، استافیلوکوک ، باسیلهای دیفتری مرف و ... اضافه شده و تشخیص را مشکل می سازند.

رنگ آمیزی

رنگ آمیزی گرم قبلاً شرح داده شده است. در رنگ آمیزی با متیلن بلو، روی گسترش ثابت شده چند قطره محلول متیلن بلو ریخته و پس از یک تا دو دقیقه رنگ را خالی کرده و گسترش را شسته و خشک می نماییم و در زیر میکروسکوپ زمینه و باکتریها به رنگ آبی دیده می شوند.

۲- کشت

این باکتری روی محیط های معمولی رشد نمی کند و به علت حساسیت فوق العاده به عوامل خارجی باید بلافاصله پس از کشت، محیط ها را در گرم خانه ۳۵°c قرار داد. این باکتری هوازی بوده و در مجاورت ۵ تا ۱۰ درصد گاز کربنیک ، بهتر رشد می کند. برای کشت گونوکوک از محیط های مختلفی مانند ژلوز شکلاتی ، مک لود، تایرمارتین و .... استفاده می شود. کلونی ها در روی محیط تایرمارتین پس از ۲۴ ساعت به بزرگی ۱-۲ میلی متر ، شفاف ، برآمده ، مرطوب ، سفید مایل به خاکستری و با حاشیه گرد یا نامنظم می باشد.

۳- آزمایش اکسیداز:

برای تشخیص نایسریا از سایر باکتریها از تست اکسیداز استفاده می شود. برای انجام این آزمایش می توان برروی کلونیهای مشکوک مقداری از محلول یک درصد هیدروکلر و تترامتیل پارافنیلن دی آمین اضافه نمود. پرگنه های نایسریا اکسیداز مثبت بوده و به رنگ ارغوانی درمی آیند. این پرگنه ها را باید فوری جدا و خصوصیات حیاتی آنها را مطالعه نمود. زیرا گونوکوکها پس از ده دقیقه در مجاورت این معرف کشته خواهند شد.

۴- مصرف قندها :

برای تمایز گنوکوک از منینگوکوک، مانند سایر باکتریها از نحوه استفاده از قندها بهره می گیرند. از پرگنه های اکسیداز مثبت که در روی محیط کشت رشد کرده اند برداشت و در محیط سیستین تریپتی کیس آگار (Cystin trypticase agar- CTA) با pH = ۷/۶ که حاوی یک درصد قند و معرف فنل رد می باشد کشت داده و نحوه مصرف قندها را مطالعه می نمایند. گنوکوک فقط از گلوکز استفاده می کند، در صورتی که منینگوکوک ، گلوکزومالتوز را استفاده نماید. (می توان از محیط های پایه قندی دیگر نیز استفاده نمود.)

برای جداسازی نایسریاهای بیماری زا از غیر بیماری زا، از کشت روی محیط ژلوز ساده و انکوباسیون در حرارت ۲۲c° استفاده می شود. انواع نایسریاهای غیربیماری زا در آگار بدون خون و در حرارت ۲۲c° رشد می نمایند در حالیکه نایسریاهای بیماری زا این خواص را ندارند و علاوه براین از نظر استفاده از قندها نیز با نایسریاهای غیربیماری زا اختلاف دارند.

خصوصیات ترپونم پالیدوم

ترپونم پالیدوم عامل بیماری مقارتبی سیفیلیس است. این بیماری دارای سه مرحله است. این باکتری متحرک و فنری شکل ، قابل انعطاف و دارای پیچهای منظم و فشرده می باشد. ضریب انکسارش کم است و با مشتقات آنیلین رنگ نمی شود. باکتری به طول ۱۸ -۴ و قطر ۰/۳-۰/۲

میکرومتر و دارای ۴ ت ۱۸ پیچ منظم است. فاصله هر پیچ حدود یک میکرومتر و زاویهٔ پیچها حاده است. دو انتهای ترپونم ، پیچ نداشته و شبیه رشتهٔ نازکی است . براساس تعداد فواصل ، شکل پیچها، اندازه و قطر ترپونم می توان آن را از سایر اسپیروکتها تشخیص داد. سایر اسپیروکتها نسبت به ترپونم پالیدوم درشت تر و حرکتشان نیز متفاوت است.

تشخیص آزمایشگاهی سیفیلیس

تشخیص بیماری سیفیلیس براساس آزمایشگاه باکتریولوژی و سرولوژیک است . در اینجا فقط به تشخیص باکتریولوژیک اشاره می شود.

۱- آزمایش مستقیم

در دورهٔ سیفلیس ، ترپونم در ترشحات شانکر و غدد لنفاوی ناحیه ای یافت می شود. در دورهٔ دوم از ترشحات حاصل از پاپول، رزئول ، پلاک موکوز، کوندیلوم و سایر ضایعات جلدی می توان ترپونم را به دست آورد. در سیفلیس مادرزادی ترپونم به تعداد زیاد در احشاء مختلف دیده می شود. در ضایعات جلدی، خون ، کبد ، طحال و قسمتهای مختلف جنین سقط شده، ترپونم به تعداد زیاد وجود دارد و به سادگی می توان آن را تشخیص داد. در هنگام برداشت از شانکر باید توجه نمود که بیمار قبلاً دارو مصرف نکرده باشد. ابتدا سطح شانکر را با سرم فیزیولوژی شسته و تأمل نموده تا خشک شود. سپس خراش مختصری در کنار یا لبه شانکر داده به صورتی که خون، جاری نگردد و سپس از سروزیته حاصل نمونه گرفته می شود.

الف – دیدن ترپونم در زمینه سیاه

مقداری از سروزیته زخم خراش داده شده را بین لام و لامل قرار داده و در زیر میکروسکوپ زمینه سیاه (Dark field) با ابژکتیو ایمرسیون حرکات ترپونم را به شکل مارپیچ ، دور محور خود، طولی یا

عرضی مشاهده می نماییم. مواردی که برای تجسس ترپونم به زمان بیشتری نیاز است بهتر است ، اطراف لام را پارافینه نمود که در اثر مجاورت با هوا ترپونم ها بی حرکت نگردند. پس از آزمایش باید لام و لامل را در مادۀ ضد عفونی کنندۀ قوی قرار داد.

ب – آزمایش پس از رنگ آمیزی

ترپونم پالیدوم با رنگ آمیزی های معمول قابل مشاهده نیست. برای رنگ آمیزی می توان از روشهایی مانند فونتانا، مرکب چین ، گیمسا و لیشمان استفاده نمود.

رنگ آمیزی فونتانا

در این رنگ آمیزی از محلولهای زیر استفاده می شود:

۱- محلول ثابت کننده یا محلول روژ .

این محلول هم گسترش را ثابت نموده و هم گلبولهای قرمز را لیز می نماید.

۲- الکل مطلق

۳- دندانه : برای دندانه زدن از محلول ۵٪ اسید تانیک استفاده می شود.

۴- فونتانا یا نیترات نقره آمونیاکی

روش رنگ آمیزی :

۱- روی گسترش محلول روژ ریخته و یک دقیقه صبر می کنیم. سپس محلول را خالی کرده ، گسترش را با آب می شوییم.

۲- روی گسترش الکل ریخته ، بعد از یک تا دو دقیقه الکل را خالی کرده و لام را خشک می نماییم.

۳- روی گسترش اسیدتانیک ریخته و آن را به ملایمت حرارت داه بطوریکه نیم تا یک دقیقه بخار متصاعد شود.باید دقت کرد که اسید تانیک نجوشد و خشک نشود . سپس محلول را خالی کرده و لام را با آب بخوبی شستشو می دهیم تا تمام بقایای اسیدتانیک شسته شود سپس لام را کاملاً خشک می نمائیم.

۴- محلول فونتانا را روی گسترش ریخته و به ملایمت حرارت می دهیم به طوریکه نیم تا یک دقیقه بخار متصاعد شود و زمینه گسترش قهوه ای رنگ گردد. لام را با آب شستشو داده و پس از خشک کردن، یک قطره روغن سدر روی گسترش ریخته و زیر میکروسکپ در زمینهٔ گندمی باکتریها را به رنگ قهوه ای مشاهده می کنیم.

ج) رنگ آمیزی با مرکب چین (رنگ آمیزی منفی)

یک قطره مرکب چین استریل را با یک قطره ترشح زخم مخلوط و روی لام گسترش تهیه نموده و صبر می کنیم تا خشک شود. در این رنگ آمیزی ترپونم ها رنگ نگرفته و در زمینه سیاه، بیرنگ دیده می شود. در این روش امکان دارد که ترپونم وجود داشته باشد ولی دیده نشود.

۲- کشت

تاکنون نتوانسته اند ترپونماهای بیماری زا را روی محیط کشت معمولی و جنین جوجه کشت دهند. ولی گزارش شده است که می توان آن را برروی سلولهای کلیه بچه هامستر گشت داد.

۳- تلقیح به حیوان

برای نگهداری ترپونم پالیدوم در آزمایشگاه از تلقیح به حیوان حساس استفاده می شود. خرگوش و بعضی از میمونها نسبت به ترپونم پالیدوم حساسند و پس از تلقیح در آنها بیماری ایجاد می شود. خرگوش از راه چشم و بیضه مبتلا می گردد. تزریق داخل چشمی کراتیت، تزریق داخل بیضه

اورکیت و اپیدیدیمیت و تزریق داخل پوست بیضه ، شانکر ایجاد می نماید. در هر صورت پس از مدت کوتاهی ، ترپونم ها خود را به غدد لنفاوی ناحیه ای رسانده و موجب آماس می گردند و در بیشتر موارد وارد خون شده و آسیبهای گوناگونی در قسمتهای مختلف بروجود می آورند.

جلسه نهم : کورینه باکتریوم و فوزواسپریل و نسان

دستور کار :

۱- آزمایش میکروسکوپی کرینه باکتریوم دیفیریه (باسیل لفلر) پس از رنگ آمیزی گرم

۲- آزمایش میکروسکوپی باسیل دیفتری مرف پس از رنگ آمیزی گرم و مقایسهٔ آن با باسیل لفلر

۳- رنگ آمیزی آلبرت و دیدن دانه های متاکروماتیک در باسیل لفلر

۴- مشاهده کشت باسیل لفلر در محیط های سرم منعقد لفلر، تلوزیت پتاسیم ، تینسدال

۵- مشاهده تخمیر قندها بوسیله کرینه باکتریوم در محیط CTA

۶- مشاهده آزمایش ویرولانس در محیط کشت به روش الک (Elek test)

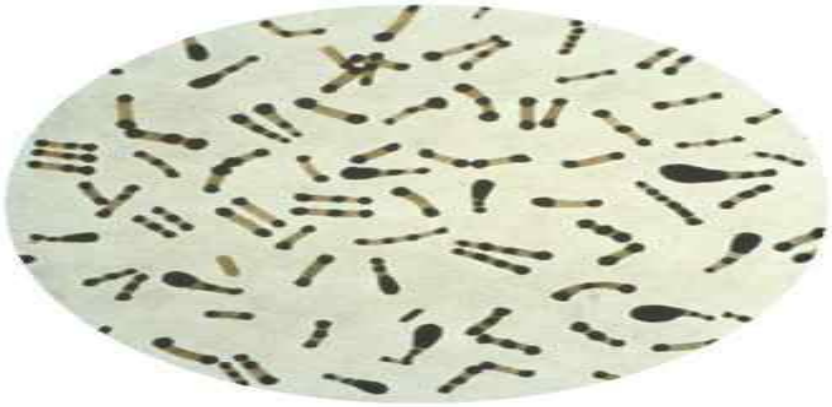
۷- مشاهده مرفولوژی لاکتوباسیل در گسترش تهیه شده از مخاط واژن

۸- مشاهده میکروسکوپی فوزواسپریل و نسان (باسیل فوزیفرم و ترپونماونسانتی)

خصوصیات کرینه باکتریوم دیفتریه :

باسیل لفلر، گرم مثبت، به طول ۵-۳ و عرض ۰/۲ تا ۰/۴ میکرومتر ، بدون کپسول و تار لرزان بوده و اغلب پلئومرفیسم دارند. باکتری گاهی مستقیم و زمانی دارای انحنای مختصری است. معمولاً یک یا دو انتهای آن بزرگتر و به شکل گرز بنظر می رسد. به این جهت آنها را کرینه باکتریوم می نامند.

طرز قرارگرفتن این باسیل اکثراً متقاطع بوده که آن را به حروف چینی با الفبای لاتین تشبیه می کنند. در رنگ آمیزی اختصاصی آلبرت یا نیسر اغلب در یک یا دو قطب آن دانه های متاکروماتیک (Methachromatic granules) مشاهده می شود. بطوریکه در روش آلبرت ، باسیلها به رنگ سبز و دانه های متاکورماتیک به رنگ آبی مایل به سیاه و در رنگ آمیزی نیسر باسیلها به رنگ قهوه ای روشن و دانه های متاکورماتیک به رنگ آبی مایل به سیاه دیده می شوند.



آرایش حروف چینی در کورینه باکتریوم

خصوصیات محیط های کشت باسیل لفلر

محیطی است غنی شده که اکثر باکتریها برروی آن رشد می کنند ولی بعنوان محیط اختصاصی کرینه باکتریوم دیفتریه بکار می رود.

۱- در روی این محیط پرگنه ها پس از ۱۸- ۸ ساعت ظاهر می شود.

۲- دانه های متاکروماتیک در گسترشی که از این محیط تهیه شده باشد بخوبی نمایان است.

۳- پرگنه سه تیپ باسیل لفلر را در این محیط نمی توان از یکدیگر تشخیص داد. پرگنه ها ابتدا مدور کوچک، سفید یا حاشیه منظم می باشد. به تدریج مرکز پرگنه ضخیم و محیط آن دندانه دار می گردد.

۴- بعضی از انواع گراویس روی این محیط رشد نمی کنند.

ب- محیط تلوریت پتاسیم

برای تهیه آن به ۱۵۰c.c ژلوز مذاب که حرارتش به ۵۰°c رسیده باشد، ۱۵c.c خون دفیبرینه خرگوش و ۱۵c.c محلول ۲٪ تلوریت پتاسیم اضافه نموده و ۱ تا ۲ دقیقه در حمام آب جوش قرار می دهیم و سپس در پلیت تقسیم نموده و پس از جامد شدن برای کشت به کار می بریم. این محیط برای جداسازی و تشخیص انواع سه گانه باسیل لفلر به کار می رود و دارای خصوصیات زیراست:

۱- تلوریت پتاسیم موجود در این محیط از رشد بیشتر باکتریهای فلورنرمال مجاری فوقانی دستگاه تنفس مانند باکتریهای گرم منفی ، انواع استافیلوکوک و استرپتوکوک ممانعت به عمل می آورد.

۲- پرگنه های انواع سه گانه دیفتری روی این محیط به خوبی از یکدیگر قابل تشخیص است. کلنی گراویس بزرگ ، مسطح ، خاکستری تا سیاه با ظاهری کدر به بزرگی ۳ تا ۵ میلی متر شبیه به گل مینا بوده و پرگنه انترمدیوس بسیار کوچک و به بزرگی ۱ میلی متر شبیه به تخم قورباغه و پرگنه می تیس سیاه، براق ، محدب به بزرگی ۲ تا ۴ میلی متر و شبیه به تخم مرغ نیمرو شده است.

۳- پرگنه باسیل لفلر ، دیفتری مرف و بعضی انواع استافیلوکوک ، تلوریت پتاسیم (K_2TeO_2) موجود در محیط را که بیرنگ است ، احیا نموده و به تلوریم سیاه رنگ تبدیل می نمایند. به همین دلیل در محیط، پرگنه ها سیاه رنگ دیده می شوند.

۴- شکل باسیل لفلر در گسترش کاملاً تی پیک نیست و دانه های متاکروماتیک کمتر مشاهده می گردد.

۵- پرگنه باسیل لفلرروی محیط پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت ظاهر می شود.

۶- برخی از انواع می تیس روی آن رشد نمی نمایند.

ج) محیط تینسدال (Tinsdale)

تینسدال محیطی مناسب برای تشخیص افتراقی کرینه باکتریوم دیفتریه از دیفتری مرف (به استثنای ک. اولسرانس و ک . پسودو توبرکولوزیس) و همچنین جداسازی باسیل لفلر در یک نمونهٔ مخلوط است.

محیط تینسدال حاوی پروتئین ، کلرور سدیم، ال سیستین و تیوسولفات سدیم، تلوریت و آگار است. انتخابی بودن این محیط برای باسیل لفلر ، به دلیل غلظت بالای تلوریت است. احیای تلوریت به تلوریم موجب سیاهی رنگ کلنی ها می گردد. در اطراف کلنی های سیاه باسیل لفلر و کرینه باکتریوم اولسرانس و کرینه باکتریوم پسودوتوبرکولوزیس هاله قهوه ای رنگی دیده می شود که به علت فعالیت آنزیم سیستئین سولفوهیدرولاز Cysteine sulfhydrolase و تشکیل فریک سولفید است. در روی این محیط باسیلهای کرینه باکتریوم دیفتریه ، کرینه باکتریوم اولسرانس و کرینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس پرگنه های صاف، خاکستری ، سیاه برجسته با هاله ای سیاه مایل به قهوه ای تشکیل می دهند . در حالیکه دیفتری مرف های دیگر هاله ای ایجاد نمی کنند.

د – محیط (Cystine Trypticase agar)

هـ - آزمایش ویرولانس در شرایط invitro (آزمایش الک Elek test)

یک نوار کاغذ خشک کن را در محلول آنتی توکسین دیفتری که در هر سانتی متر مکعب آن هزار واحد آنتی توکسین وجود دارد، فرو برده در امتداد قطر پلیت محتوی مواد غذایی که هنوز جامد نشده است، قرار داده و پس از سفت شدن محیط، باسیل دیفتری را همراه با کنترل مثبت و منفی ، عمود بر نوار کاغذ کشت داده و در انکوباتور ۳۷c̊ قرار می دهند. اگر باکتری سم زا باشد پتس از ۲-۳ روز خطوط سفید رنگی که از ترکیب سم و ضد سم بوجود آمده است دز زاویهٔ ۴۵˚ خط کشت و نوار کاغذ دیده خواهد شد.

رنگ آمیزی آلبرت (Albert staining)

۱- گسترش تهیه شده را با حرارت ثابت کنید.

۲- گسترش را مدت ۶ دقیقه تحت تأثیر محلول آلبرت قرار دهید.

۳- با پوارلام را از مرکز گسترش خشک کنید.

۴- لام را مدت ۳ الی ۴ دقیقه تحت تأثیر محلول لوگل قرار دهید.

در این روش پروتوپلاسم باکتری به رنگ سبز و دانه های کروماتیک به رنگ آبی مایل به سیاه مشاهده می گردند.

لاکتوباسیل

باکتریهایی هستند گرم مثبت ،بی حرکت ، بدون اسپور و کپسول که پلئومرفیسم دارند. به شکل تک تک، دوبدو، گاه شبیه به زنجیره می باشند که درگسترش تهیه شده از مخاط واژن همراه سلولهای اپی تلیال مشاهده می گردند.

فوزواسپریل و نسان

آنژین و نسان یا (Acute ulcerative gingivitis) (Fusospirochetal disease) عفونتی است بی هوازی که با درد، خونریزی ، بوی بد ، تخریب پاپیلای بین دندانی ، التهاب ، تحلیل حاشیه لثه ها و

تشکیل غشاء کاذب در دهان همراه است و در شرایط محیطی نامناسب ، سوء تغذیه ، بهداشت ضعیف دهان و هوای گرم ایجاد می شود.

این عفونت توسط باسیل فوزیفرم و ترپرنما و نسانتی ایجاد می شود. چون بطور معمول کشت بی هوازی ترشحات حلق انجام نمی شود در تشخیص آنژین و نسان ، علاوه بر علائم بالینی می توان از آزمایش مستقیم بهره جست.

در گسترش علاوه بر باکتریهای فلور نرمال محوطه دهانی ، ترپونما و نسانتی دارای ۳ تا ۸ پیچ نامنظم ، گرم منفی و باسیلهای فوزیفرم نیز گرم منفی ، دوکی شکل با انتهای تیز دیده می شوند.

جلسهٔ دهم : باسیلاسه (باسیلوس و کلستریدیوم)

دستور کار :

۱- مشاهده میکروسکوپی باسیلوس آنتراسیس در نسج

۲- مشاهده میکروسکوپی باسیلوس آنتراسیس پس از رنگ آمیزی گسترش به روش گرم

۳- رنگ آمیزی اسپور به روش سبز مالاشیت (مالاشیت گرین یا ورمالاشیت)

۴- رنگ آمیزی اسپور به روش مولر

۵- مشاهده پرگنه های باسیلوس انتراسیس و باسیلوس سرئوس در ژلوز ساده

۶- مشاهده میکروسکوپی کلستریدیوم در نسج

۷- کشت کلستریدیوم و پسودوموناس ائروژینوزا در محیط تیوگلیکولات

در خانوادهٔ باسیلاسه ۶ جنس قرار دارد که همگی گرم مثبت و اسپوردار می باشند . از بین این باکتریها دو جنس از نظر بیماری زایی حایز اهمیت است که به شرح آنها می پردازیم:

۱- باسیلوس که هوازی است . (Bacillus)

۲- کلستریدیوم (clostridium) که بی هوازی است.

باکتریهای این دو جنس باسیلهای گرم مثبت ، اسپور دار و درشت می باشند و در خاک ، آب و روده انسان یا حیوانات مختلف یافت می شوند. اسپور آنها ممکن است به شکل گرد یا بیضی ، مرکزی ، انتهایی یا نزدیک به انتها دیده شود. در برخی از آنها چون قطر اسپور باکتری بیشتر است، باعث تغییر شکل باسیل می گردد و از این خاصیت در طبقه بندی آنها استفاده می شود.

باسیلوس

در بین باسیلوسهای شناخته شده، دو نوع از نظر بیماری زایی برای انسان اهمیت بیشتری است :

۱- باسیلوس آنتراسیس (B.anthracis) که می تواند در انسان و حیوان ایجاد بیماری سیاه زخم (Anthrax) نماید. این بیماری در انسان به سه شکل پوستی ، تنفسی و گوارشی دیده می شود.

۲- باسیلوس سرئوس (B.cereus) که عامل مسمومیت غذایی بوده و علاوه براین می تواند به عنوان پاتوژن فرصت طلب عمل نماید. برخی از باسیلوسها به علت قدرت تخمیری زیاد باعث تجزیه

مواد قندی و پروتئینی شده و در فساد مواد غذایی نقش دارند. این باکتریها به حالت ساپروفیت در هوا، خاک ، آب ، شیر، سبزیجات ، گرد و غبار، مدفوع و ... زندگی می کنند، که از نظر شکل ظاهری و رنگ آمیزی به باسیلوس آنتراسیس شباهت دارند و آنتراکوئید نامیده می شوند. باسیلوس آنتراسیس که سابقاً به آن باسیل شاربن گفته می شد، باکتری است هوازی ، گرم مثبت ، درشت، بی حرکت که اسپور آن بیضی شکل است. دو انتهای باکتری زاویه دار است. در نمونه های بالینی ، باسیلها به صورت تک تک ، دوتایی و یا زنجیره های کوتاه با کپسول و بدون اسپور دیده می شوند، اندازه گیری (۸-۴) × (۱-۰/۵) میکرومتر می باشد. در گسترش تهیه شده از کشت ، باسیل شاربن به صورت زنجیره های درهم پیچیده مشاهده می شود.

سویه های ویرولان (با قدرت بیماریزایی)، دارای کپسول از جنس پلی پپتید (اسید گلوتامیک) است و سویه های غیر ویرولان (بدون قدرت بیماریزایی) فاقد کپسول است. کپسول عامل اصلی مقاومت در مقابل فاگوسیتوز است. باسیل سیاه زخم روی بافت میزبان تولید اسپور نمی کند و فقط تحت شرایط نامساعد روی مواد بیجان (خاک و ...) اسپور ایجاد می کند. این باکتریها به آسانی روی ژلوز ساده در حرارت ۳۷c° رشد می کنند ولی اگر در حرارت ۴۳c° رشد داده شود، قدرت بیماری زایی خود را از دست می دهد. پرگنه های این باسیل برجسته ، غیر منظم و خشن بوده و اطراف آن رشته هایی شبیه به موی مجعد وجود دارد و از این نظر به آنها پرگنه های ریزوئید (Rhizoid colony) می گویند.

کشت عمقی باسیلوس آنتراسیس در ژلاتین به صورت عمودی،ایجاد پدیده ای به نام « سرووارونه » می کند. علت پدیده این است که باکتری ضمن رشد و تکثیر در طول خط کشت ، رشته هایی به اطراف می فرستد. این رشته ها در بالا طول بیشتری دارند و پس از ۲۴ ساعت در حرارت ۲۲c° ، منظره ای شبیه به سرووارونه پیدا می کند. سپس ژلاتین را به کندی از بالا به پایین ذوب می نماید. باسیلوس آنتراسیس نیترات را به نیتریت احیا کرده و نشاسته را هیدرولیز می کند. آزمایش (VP) وژس پروسکوئر نیز مثبت است. باسیلهای شبیه سیاه زخم را آنتراکوئید می نامند که گاه

متحرک و عموماً بدون کپسول هستند، سرووارونه ایجاد نمی کنند، ژلاتین را بـه سـرعت ذوب مـی کنند و ممکن است به صورت باسیلهای گرم منفی بنظر برسند.

رنگ آمیزی مولر

۱- گسترش را با حرارت ثابت کنید.

۲- گسترش را مدت ۵ دقیقه تحت تأثیر اسید کرومیک ۵ درصد قرار دهید.

۳- لام را با آب بشوئید.

۴- فوشین فنیکه غلیظ را روی لام بریزید و به ملایمت حرارت دهید تـا بـه مـدت ۱۰ دقیقـه بحار متصاعد شود ولی رنگ روی لام نجوشد و خشک نشود.(توصیه می شود برای حـرارت دادن لام را برروی پایه فلزی قرار دهید.)

۵- لام را با آب بشوئید.

۶- بوسیله الکل مطلق عمل رنگ بری را انجام دهید تا گسترش به رنگ گلی کم رنگ درآید.

۷- لام را با آب بشوئید.

۸- متیلین بلو را روی گسترش ریخته و ۳ دقیقه صبر کنید.

۹- لام را با آب بشوئید.

پس از خشک کردن لام با استفاده از روغن سدر و عدسی ۱۰۰ آنرا زیر میکروسکوپ مطالعـه کنیـد. اسپورها به رنگ قرمز و باسیلها به رنگ آبی دیده می شوند.

رنگ آمیزی سبز مالاشیت (مالاشیت گرین یا ورمالاشیت)

۱- گسترش را با حرارت ثابت نمایید.

۲- محلول ۵٪ سبز مالاشیت را روی گسترش ریخته و ۵ دقیقه به ملایمت حرارت دهید تا بخار متصاعد شود ولی رنگ نجوشد و خشک نشود.

۳- لام را با آب بشویید.

۴- محلول ۵٪ سافرانین روی گسترش ریخته و ۳ دقیقه صبر کنید.

۵- لام را با آب بشویید.

پس از خشک کردن لام با استفاده از روغن سدر و عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ آن را مطالعه نمایید . اسپورها به رنگ سبز وباسیلها به رنگ قرمز دیده می شوند.

کلستریدیومها :

جنس کلستریدیوم شامل باسیلهای درشت و گرم مثبت می باشند. بی هوازی مطلق یا میکروائروفیل بوده و تولید اسپور می نمایند. اسپور به شکل گرد یا بیضی بوده و حجم آنها اغلب از عرض باسیل زیادتر است و موجب پیدایش برجستگی در باسیل می گردد. اکثر کلستریدیومها فاقد کپسول بوده و متحرکند ولی کلستریدیوم پرفرنژنس (Cl.perfringens) و بوتیریکوم (Cl. Butyricum) کپسول دار و بی حرکت هستند . اغلب کلستریدیومها ساپروفیت بوده و در روده و مدفوع انسان و حیوانات مختلف یافت می شوند. بیشتر آنها فاقد کاتالاز ، سیتوکروم اکسیداز و پراکسیداز می باشند و اکثراً انرژی خود را از راه تخمیر قندها بدست می آورند.

برخی نیز دارای آنزیم پروتئولیتیک هستند. اکثراً در زخمهای نکروزه ، کلستریدیومها به همراه باکتریهای گرم منفی مانند اشریشیاکلی بوده و به همین دلیل به منظور جداسازی کلستریدیومها با توجه به مقاومت اسپورها، از شوک حرارتی استفاده می شود. یعنی ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از کشت در محیط تیوگلیکولات و مشاهده اسپور در کشت مایع ، به مدت نیم ساعت در حرارت ۸۰ċ نگه داشته ، در این حرارت اسپورها زنده مانده و ساپرباکتریها از بین می روند. سپس از این مایع برروی ژلوز خون دار کشت داده می شود.

در بین انواع بیماریزا، کلستریدیوم به بوتولینوم (Cl.botolinum) عامل مسمومیت غذایی بوتولیسم ، کلستریدیوم تتانی (Cl.tetani) عامل کزاز ، کلستریدیوم پرفرنژانس (Cl.perfringes) ، کلستریدیوم سپتیکوم (Cl.septicum) و کلستریدیوم نووه ای مهمترین عامل ایجاد کنندهٔ میونکروزیس می باشند. کلستریدیوم بوتولینوم باسیل درشتی است که دو سر آن گرد است. اسپور بیضی شکل و نزدیک به انتها است و موجب برجستگی در باسیل می شود. کلستریدیوم پرفرنژنس دارای دو سر گرد و یک اسپور نزدیک به انتها و بیضی شکل است. ولی چون قطر اسپور کم است، برجستگی ایجاد نمی کند. کلستریدیوم سپتیکوم دارای دو سر گرد بوده که گاه مستقیم و گاهی خمیده و به صورت پلئومرف مشاهده می گردد. اسپور بیضی شکل ، مرکزی یا نزدیک به انتهاست . تخمیر قندها نقش مهمی در تشخیص این باسیلها از یکدیگر دارد.

روش کار :

۱- مشاهده میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده کلستریدیوم در نسج .

کلستریدیوم ها در آزمایش مستقیم به صورت باسیل های گرم مثبت ، درشت با دو انتهای گرد و پلئومرف مشاهده می شوند. غالباً سلولهای دفاعی در گسترش وجود ندارد.

۲- کشت باکتری در محیط تیوگلیکولات

آبگوشت تیوگلیکولات (Thioglycolate broth) حاوی پروتئین ، گلوکز ، کلرورسدیم ، تیوگلیکولات سدیم، مواد احیا کننده و آگار به میزان ۰/۱٪ است.

تیوگلیکولات ، ال سیستین ، سولفیت سدیم و آگار موجب کاهش و تثبیت پتانسیل اکسیداسیون احیای محیط می شوند و در نتیجه بسیاری از باکتریهای بی هوازی اجباری می توانند بدون پوشاندن سطح محیط با پارافین در محیط رشد نمایند.

بوسیله آنس دو حلقه از کشت باکتری در محیط تیوگلیکولات برداشت کرده و در عمق محیط تیوگلیکولات جدید کشت دهید.

جلسهٔ یازدهم : مایکوباکتریا

دستور کار :

۱- مشاهده میکروسکوپی مایکوباکتریوم بوویس پس از رنگ آمیزی گسترش به روش زیل نلسون

۲- مشاهده میکروسکوپی مایکوباکتریوم توبوکولوزیس (باسیل کخ) در خلط

۳- مشاهده میکروسکوپی مایکوباکتریوم لپره در نسج

۴- مشاهده کلنی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در محیط لونشتاین جانسون Lowenstein-Jensen

مایکوباکتریومها باکتری هایی باسیل شکل ، صاف ، کمی خمیده با اندازه های (۱۰-۰/۲) × (۰/۴ - ۰/۲) میکرومتر ، بی حرکت و بدون اسپور هستند. دیواره سلولی آنها حاوی مقادیر زیاد چربی است و به همین دلیل با روشهای معمول و استفاده از رنگهای آنیلینی در درجهٔ حرارت اتاق رنگ نمی گیرند. در نتیجه با استفاده از افزایش زمان زنگ آمیزی و حرارت ، رنگ آمیزی می شوند و در مقابل عمل بی رنگ کردن با اسید کلریدریک ۳٪ و اتانل ۹۵٪ مقاومت می کنند. به این خاصیت اسیدفست یا اسید الکل فست بودن (Acid alcohol fast و Acid fast) اطلاق می گردد.

مایکوباکتریومها هوازی اجباری بوده و آهسته تر از دیگر باکتری های بیماریزای انسانی ، رشد می کنند. جنس مایکوباکتریوم شامل ۵۴ گونه است. مهمترین گونه ها مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و مایکوباکتریوم لپره عامل سل و جذام است. جداول ، شماره ۱ و ۲ انواع بیماری زا مایکوباکتریوم را نشان می دهد.

بیشتر مایکوباکتریوم هایی که با بیماری های انسانی مرتبطند، برای رشد به محیط های کمپلکس و ۲ تا ۶ ، هفته انکوباسیون در درجه حرارت اپتیمم نیاز دارند. مایکوباکتریوم لپره عامل بیماری جذام در خارج از بدن رشد نمی کند.

تشخیص مایکوباکتریوم

جداسازی موفق این باکتریها از نمونه های بالینی با نمونه گیری و انتقال مناسب آغاز می شود. (در این بخش به جداسازی مایکوباکتریومهایی پرداخته می شود که در خارج از بدن قادر به رشد هستند.)

حتی الامکان نمونه ها باید قبل از درمان گرفته و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شود. در غیر این صورت حداکثر تا یک شبانه روز می توان آنها را در یخچال نگهداری کرد. به دلیل گستردگی بیماریهایی که عامل آن مایکوباکتریومها هستند، نمونه هایی مختلفی ممکن است برای تشخیص فرستاده شوند. نمونه هایی که برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و مایکوباکتریومهای غیرسلی MOTT[10] در بیماری های تنفسی فرستاده می شوند عبارتند از:

خلط ، آسپیره برنش Bronchial washing, Bronchial aspiration

Bronchioalveolo lavage (BAL) یا Transbronchial biopsy و شیره معده است. شیره معده صبح ناشتا از بیمار گرفته می شود. در مورد کودکانی که مبتلا به توبرکولوز ریوی اولیه بوده و دارای لزیون های کازئوز محدود هستند و تعداد نسبتاً کمی باسیل دارند، به جای خلط ، آزمایش شیره معده توصیه می گردد.

[10] - Mycobacterium other than tubrculosis

در بیماران مبتلا به سل دستگاه ادراری ، ادرار اول صبح (حداقل ۱۵ سی سی) گرفته می شود. ادرار ۲۴ ساعته به علت آلودگی قابل قبول نیست.

بررسی مدفوع در تشخیص بیماریهای مایکوباکتریال در افراد مبتلا به ایدز و افراد در معرض خطر (High risk) توصیه می گردد.

آزمایش خون در بیماران مبتلا به ایدز و بررسی بافت و مایعات بدن مانند مایع مغزی- نخاعی ، مایع آسیت و ... در مواردی کمک کننده است.

تکنیکهای سریع شامل رادیومتریک کالچر سیستم (BACTEC) [11] برای جداسازی ، تست حساسیت و تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس از سایر مایکوباکتریومهای سطحی استفاده می شود.

برای تشخیص نمونه های جدا شده از کشت، از تعداد محدودی پروبهای اسید نوکلئیک اختصاصی گونه نیز بهره می جویند و برای افزایش حساسیت پروب های اسیدنوکلئیک کاربرد PCR [12] پیشنهاد می گردد روشهای دیگری مانند Liquidchromatography, Thin layer Gas chromatography (GLC) و اخیراً High performance Liquid chromatography برای تشخیص انواع مایکوباکتریومها بکار می رود.

ساده ترین راه تشخیص پاراکلینیکی ، آزمایش مستقیم و کشت برروی محیطهای مصنوعی است. اگر چه حساسیت آزمایش مستقیم در تشخیص کمتر از کشت است ولی اطلاعات اولیه را در اختیار پزشک قرار می دهد.

کشت :

برای کشت مایکوباکتریومها از محیط های مختلفی مانند دور سه (Dorset) ، پتروف (Petroff) و هرالد (Herrald) ، دوبوس (Dubos) و لونشتاین جانسون (Lowenstein Jensen) استفاده می شود که متداولترین آنها محیط لونشتاین (LJ) است. این محیط دارای تخم مرغ، گلیسرول، عصاره سیب

[11] - Radiometric culture system
[12] - Polymerase chain reaction

زمینی، نمک ، آسپارژین و مالاشیت گـرین اسـت. مایکوباکتریومهـا بـه ترکیبـات سـمی حاصـل از متابولیسم حساس می باشند و وجود عصاره سیب زمینی ، گلیسرول و تخم مرغ موجب سـم زدایـی محیط گشته و همچنین برخی از مواد غذایی ضروری رشد را فراهم می کنند. مالاشـیت گـرین نیـز رشد باکتریهای آلوده کننده را متوقف می کند. افزودن آسپارژین به محیط نیز موجب حداکثر تولید نیاسین توسط برخی مایکوباکتریومها می گردد. این باکتریها شدیداً هوازی و کند رشد هسـتند (GT مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۲۰ تا ۲۲ ساعت است) و حدود یک تا دو ماه طول می کشد تـا بـاکتری رشد کند و دراین مدت از کلنی حاصل گسترش تهیه و به جستجوی مایکوباکتریوم می پردازند.

مرفولوژی پرگنه ، سرعت رشد، حرارت اپتیمم و واکنش به نور، خصوصیات فنـوتیپیکی هسـتند کـه به جداسازی این باکتریها کمک می کند. افتراق انواع مایکوباکتریومها براساس ویژگیهای زیـر انجـام می شود.

مرفولوژی پرگنه (نوع S وR) ، محدوده حرارتی رشـد، سـرعت رشـد (سـریع ، آهسـته) ، پیگمـان (فوتو، اسکوتو، نان فتوکروموژن)[۱۳]، آریل سولفاتاز، منبع کربن، کاتالاز، جـذب آهـن (Iran uptake) نیاسین ، احیای نیترات ، پیرازین آمیداز، رشد در ۵٪ کلرورسدیم، احیای تلوریت ، تولید اوره آز و ... مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس (عوامل سل انسانی و گاوی) کلنی های کوچـک کم رنگ، خشک و خشن دارند که تدریجاً بزرگ شده و بهم می چسبند.

وجود موادی چون موسین یا مواد آلی در نمونه های بالینی ، فراوانی ارگانیزمهای غیر مایکوباکتریال و سرعت رشد آنها، موجب می گردد رشد مایکوباکتریومها تحت الشعاع قـرار گیـرد. بـه دو دلیـل از روش هضم و آلودگی زدایی digestion- decontamination استفاده می شود:

۱-سیال نمودن نمونه از طریق هضم مواد پروتئینی

۲-از بین بردن ارگانیزمهای غیر مایکوباکتریومی در زمان تمـاس بـا مـواد شـیمیایی و آلـودگی زدا، عمل هضم و سیال شدن نمونه به تغلیظ باکتریها کمک کرده و تمـاس باکتریهـا را بـا مـواد غـذایی

[13] - Photochromogen, Scotochromogen, nonphotoreactive (nonchromogen)

محیط امکانپذیر می سازد. مقدار بالای چربی موجود در دیوارۀ سلولی مایکوباکتریوم ، موجب مقاومت آنها در برابر عمل Killing مواد شیمیایی می گردد. نمونه هایی که از بافتهای عمقی و یا از قسمتهای استریل برداشت می شود مانند مایع مغزی نخاعی یا مایع مفصلی نیاز به آلودگی زدایی ندارند ولی نمونه هایی مانند خلط، شیره معده، مایع شکمی ، ادرار، بافتهای آلوده و ... نیاز به آلودگی زدایی دارند. برای عمل هضم و آلودگی زدایی می توان ازمواد و محلولهای مختلفی [۱۴] بهره جست و ساده ترین آنها استفاده از سود ۴-۳ درصد است. بعد از عمل هضم و آلودگی زدایی ، نمونه ها را سانتریفوژ کرده و از رسوب حاصل گسترش تهیه کرده و برروی محیط مخصوص نیز کشت می دهند.

Oxalic acid 5%
NALC [N-acetyle- L- cystein (dithiothreitol) + Na. lydroxide]

آزمایش میکروسکوپی :

مطالعه میکروسکوپی گسترش پس از رنگ آمیزی اسیدفست روشی ساده و سریع است. مایکوباکتریومها یکنواخت رنگ نمی گیرند و منظرۀ دانه دار پیدا می کنند. رنگ آمیزی اسیدفست برپایۀ بالا بودن محتویات چربی دیوارۀ سلولی و مقاومتشان به اسید والکل است. روشهای متداول اسیدفست عبارتند از : زیل نلسون، کینیون (Kinyoun) که از کبول فوشین به عنوان رنگ اصلی، اسید الکل به عنوان مایع رنگ بر و متیلن بلو به عنوان رنگ زمینه استفاده می شود. در روش زیل نلسون از حرارت استفاده می شود، در حالیکه در روش کینیون که فوشین سرد نیز نامیده می شود از حرارت بهره نمی گیرند.

[14] - Benzal. Konium chloride
NALC [N-acetyle- L- cystein (dithiothreitol) + Na.lydroxide]

استفاده از رنگهای فلورسنت اورامین و اورامین ردامین قابل اعتمادتر و اختصاصی تر است. در این روش گسترش را با بزرگنمایی چشمی ۲۵ × ۴۰ تحت لامپ جیوه ای با فیلتر آبی بررسی می نمایند. در موارد مثبت باسیلها در زمینه تاریک به صورت زرد نارنجی و درخشان دیده می شوند.

رنگ آمیزی زیل نلسون (Ziehl- Neelsen)

۱- گسترش تهیه شده را با حرارت ثابت کنید.

۲- محلول فوشین روی گسترش ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده ، بطوریکه بخار متصاعد شود ولی نجوشد و خشک نشود. به محض تبخیر رنگ ، فوشین تازه به نمونه اضافه شود.

(در روش کینیون از حرارت استفاده نمی شود ولی رنگ فوشین به مدت ۱۵ دقیقه برروی لام می ماند.

۳- لام با آب شسته شود.

۴- گسترش ر با محلول اسید و الکل بی رنگ می نمائید. در این مرحله به پشت و روی لام توجه نمایید.

۵- لام با آب شسته شود.

۶- روی لام متیلن بلو ریخته و ۴ دقیقه صبرکنید.

۷- لام را با آب بشویید.

۸- لام را خشک کرده و یک قطره روغن سدر روی گسترش گذاشته و با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ مطالعه نمائید. باسیلها در زمینه آبی به رنگ قرمز دیده می شوند.

توجه : لام تهیه شده مخلوطی از واکسن BCG و خلط است. در این حالت مایکوباکتریوم بوویس کوتاه، کلفت و مستقیم است و یکنواخت رنگ می گیرد. باسیل انسانی ، دراز ، باریک و خمیده است و یکنواخت رنگ نمی شود.

مایکوباکتریوم لپره (باسیل هانس (Mycobacterium Leprae)

عامل بیماری جذام ، عفونت پوست ، غشاء مخاطی و اعصاب پری فرال است. باسیلی است به اندازه های (۷-۱) × (۰/۵ – ۰/۳) میکرون، مستقیم و گاه خمیده ، بیشتر در داخل منوسیتها و هیستوسیت ها قرار داشته و به صورت توده های کروی شکل به دور یکدیگر جمع می شوند. که گلوبی گفته می شود. تشخیص بیماری جذام براساس مشاهده میکروسکوپی باسیل اسیدفست در بیوپسی و تراشه های پوست است. رنگ آمیزی نمونه نیز به روش زیل نلسون انجام می شود.

جلسهٔ دوازدهم

- **آنتروباکتریاسیه (باسیلهای گرم منفی روده ای)**
- **باسیلهای گرم منفی غیر تخمیری**

دستور کار:

۱- کشت اشریشیاکلی ، شیگلا، سالمونلاپاراA، سالمونلاپارا B، سالمونلاتیفی روی محیط مکانکی یا دزاکسی کلات آگار.

۲- کشت یکی از باکتریهای اشریشیاکلی ، شیگلا، سالمونلا پاراA ، سالمونلاپاراB، سالمونلاتیفی و پسودوموناس آئروژینوزا در سطح و عمق محیط کلیگلرآیرون آگار

۳- کشت اشریشیاکلی یا انتروباکتر در محیط آب پپتونه برای انجام آزمایش اندل

۴- کشت اشریشیاکلی یا انتروباکتر در محیط MP-VP

۵- کشت پروتئوس در محیط اوره برای انجام آزمایش اوره آز

۶- کشت پروتئوس درمحیط ژلوز ساده برای مشاهدهٔ پدیده سورامینگ

۷- کشت در محیط حرکت (motility)

۸- مشاهده آزمایش سیترات

۹- مشاهده محیط OF

۱۰- کشت پسودوموناس ائروژینوزا در ژلوز ساده در لوله برای مشاهده پیگمان .

خانواده آنتروباکتریاسیه باسیلهای گرم منفی بدون اسپور، اکسیداز منفی ، گلوکز مثبت بوده و نیترات را نیز احیا می کنند. برخی متحرک و بعضی دارای کپسول هستند. این باسیلها از نظر شکل شبیه یکدیگر به طول ۲ تا ۴ میکرون و عرض ۰/۵ تا ۲ میکرون می باشند. به خوبی برروی محیطهای ساده مانند ژلوز رشد کرده و پرگنه های مشابهی ایجاد می کنند. چون در اکثر نمونه های بالینی با باکتریهای دیگر مخلوط هستند برای جداسازی آنها از محیط های انتخابی استفاده می نمایند. وجود رنگها (بریلیانت گرین یا کریستال ویوله) ، نمکهای صفراوی مانند دزاکسی کلات سدیم در این محیط ها از رشد باکتریهای گرم مثبت و برخی از باسیلهای گرم منفی غیر بیماریزای

روده ای ممانعت به عمل می آورند. براساس غلظت این عوامل، محیطهای فوق الذکر را به سه گـروه تقسیم می نمایند:

۱- محیط های Low selective مانند مکانکی (Mac) یا ائوزین متیلن بلو (EMB) یا دزاکسـی کلات آگارDC)

۲- محیطهـای Moderate selective ماننـد سـالمونلا، شـیگلا آگـار (SS) ، دزاکسـی کـلات سیترات آگار (DCC) ، هکتـون انتریـک آگـار (HE) و زایلـوزلیزین دزاکسـی کـلات آگـار (XLD)

۳- محیطهای high selective مانند بریلیانت گرین آگار(BG) یا بیسموت سولفیت آگـار (BS) اکثر این محیط های انتخـابی ، افتراقـی نیـز هسـتند و باسـیلهای گـرم منفـی روده ای را براساس تخمیر قند لاکتوز جدا می کنند.

برای جداسازی سالمونلا و شیگلا از نمونه های مدفوع نیز از محیط های غنی کننده مانند آبگوشـت تتراتیونات (tetrationate broth) یا سلنیت اف (selenit F. broth) استفاده می شود. ترکیبـات ایـن محیط رشد سالمونلا و شیگلا را افزایش داده و از رشـد باکتریهـای فلـور نرمـال روده ممانعـت مـی نمایند. پس از انکوباسیون چند ساعته، از این محیطها ، برداشت کرده و روی محیطهـای انتخـابی و افتراقی کشت می دهند.

باسیلهایی که مورد مطالعه قرار می گیرند عبارتند از :

۱- اشریشیا کلی
۲- انتروباکتر
۳- شیگلا
۴- پروتئوس
۵- پسودوموناس ائروژینوزا
۶- سالمونلا پارا A
۷- سالمونلا پارا B
۸- سالمونلا تیفی .

۱- کشت روی محیط انتخابی

برای کشت باکتریهای اشرشیاکلی ، شیگلا ، سالمونلاتیفی ،

سالمونلا پاراA ، سالمونلاپاراB در محیط های افتراقی ، از

باکتریهایی فوق جدا گانه برداشت نموده و بالوپ برروی محیط
مکانکی یا دی اکسی کلات آگار(DC) مطابق شکل کشت دهید.
در این محیط کلنی اشریشیاکلی صورتی یا قرمز و کلنی بقیه باکتریها بی رنگ است.

مکانکی آگار (MacConkey agar)

محیطی انتخابی(Selective) و افتراقی (differential) است که برای کشت باسیلهای گرم منفی هوازی، بی هوازی اختیاری به کار می رود. این محیط حاوی پروتئین ، نمکهای صفراوی ، کلرورسدیم، لاکتوز ، معرف نوترال رد، کریستال ویوله و آگار است . انتخابی بودن محیط به علت کریستال ویوله و نمکهای صفراوی است که از رشد باکتریهای گرم مثبت و باکتریهای گرم منفی دیر رشد جلوگیری می کنند. باسیلهای گرم منفی روده ای روی محیط به خوبی رشد کرده و براساس تخمیر لاکتوز از هم تفکیک می شوند. باسیلهایی که لاکتوز را تخمیر می نمایند، پرگنه های صورتی یا قرمز و آنهایی که لاکتوز را تخمیر نمی نمایند، پرگنه های بی رنگ ایجاد می کنند.

۲- کشت روی محیط کلیگلرآیرون آگار(KIA: Kligler Iron Agar)

لوپ را به صورت نیزه ای در آورده و پس از استریل کردن، یکی از باکتریهای اشریشیاکلی، سالمونلاپاراA، سالمونلاپارا B ، سالمونلاتیفی ، شیگلا، پسودوموناس ائروژینوا را برداشت کرده و ابتدا در عمق و سپس در سطح شیبدار به صورت خطوط زیگزال کشت می دهیم. در این محیط براساس تخمیر کربوهیدرات های گلوکز، لاکتوز، تولید گاز (H_2, Co_2) ، هیدروژن سولفید (H_2S) تشخیص اولیه باسیلهای گرم منفی داده می شود. این محیط حاوی پروتئین ، کلرورسدیم ، لاکتوز، گلوکز، یک منبع گوگرد(تیوسولفات سدیم)، معرف آهن دار (فریک آمونیوم سیترات) ، معرف فنل رد و آگار است. میزان لاکتوز ده برابر گلوکز است. باکتریهایی که از گلوکز استفاده می نمایند، اسید تولید کرده و رنگ محیط را از قرمز به زرد تبدیل می کنند. طی استفاده از گلوکز، اسید ایجاد شده

در عمق لوله (پدیده Fermentation) بیشتر از اسید ایجاد شه در سطح مـی باشـد و در ضـمن ایـن ارگانیسمها از دکربوکسیلاسـیون اکسـیداتیو (Oxidative decarboxylation) پپتـون هـای محـیط، ترکیبات قلیایی ایجاد می نمایند که مقادیر کم اسید را در سطح محیط خنثی نموده ولـی قـادر بـه خنثی کردن مقادیر زیاد اسید در عمق لوله نیستند. در نتیجه بعد از انکوباسـیون ۲۴ سـاعته ، رنـگ قرمز در سطح و رنگ زرد در ته لوله نمایانگر تخمیر گلوکز و عدم تخمیر لاکتـوز اسـت. باکتریهـایی که علاوه بر گلوکز، لاکتوز را نیز مصرف می کنند، مقادیر زیادی از اسید در سطح ایجـاد مـی کننـد که بوسیله محصولات قلیایی حاصل از پپتن ها خنثی نمی گردد، در نتیجه سطح و ته لولـه ، هـر دو به رنگ زرد باقی می ماند. تولید گاز (CO_2 و H_2) به صورت شکاف یا حبابهایی در ته لوله مشـخص می گردد.

تولید H_2S به علت احیای تیوسولفات است. این گاز بیرنگ بوده و با حضور معرف آهن دار مشـخص می گردد. H_2S با یون فریک ترکیب و رسوب سیاه سولفید فروس (FeS) تولید مـی گـردد. احیـای تیوسولفات در شرایط اسیدی صورت می گیرد و رنگ سیاه غالباً در ته محیط دیده می شود.

تفسیر محیط KIA

تخمیر گلوکز و لاکتوز Glucose+ Lactose fermented	اسید در عمق، اسید در سطح Acid slant/Acid butt.	زرد – زرد Yellow / Yellow
تخمیر گلوکز Glucose Fermented	اسید در عمق ، قلیا در سطح Alkaline slant/Acid butt.	زرد – قرمز Red/yellow
عدم تخمیر گلوکز و لاکتوز Glucose & Lactose nonfermental	قلیا در عمق ، قلیا در سطح Alkaline slant/Alkaline butt.	قرمز – قرمز Red / Red

تولید گاز ← تشکیل حباب و یا ترک خوردن محیط

Gas produced		bubbles or cracks
تولید گاز هیدروژن سولفوره	←	رسوب سیاه رنگ
Hydrogen sulfide gas produced		Black perciptiated

تذکر : علاوه بر محیط KIA محیط دیگری به نام تریپل شوگرآیرون آگار (TSI) نیز جهت بررسی تخمیر قندها توسط اعضای خانواده انتروباکتریاسیه مورد استفاده قرار می گیرد، که علاوه بر دو قند گلوکز و لاکتوز دارای قند دیگری به نام سوکروز می باشد.

نام باکتری	رنگ کلنی در محیط Mac یا DC	تخمیر لاکتوز	تخمیر گلوکز	ایجاد گاز	ایجاد H_2S	خلاصه
اشریشیاکلی	صورتی	+	+	+	–	A/A Gas+ H_2s-
شیگلا	بی رنگ	–	+	–	–	K/A Gas- H_2s-
سالمونلاتیفی	بی رنگ	–	+	–	+	K/A Gas- h_2s+
سالمونلا A	بی رنگ	–	+	+	–	K/A Gas+ H_2s-
سالمونلا B	بی رنگ	–	+	+	+++	K/A Gas+ H_2s+++
پسودوموناس	بی رنگ	–	–	–	–	$K/K_{(NG)}^{*}$ Gas- H_2s-

۳- کشت در محیط آب پپتونه

برای انجام آزمایش اندول از اشریشیاکلی یا آنتروباکتر برداشت نموده و در آب پپتونه ، کشت دهید. اساس این آزمایش تولید اندول از تریپتوفان است . برخی باکتریها توسط آنزیم تریپتوفاناز محیط را اکسیده کرده و تولید اندول می نمایند.

$$\text{Tryptophan} \xrightarrow{\text{Tryptophanase}} \text{Indol + skatole + Indol acetic acid}$$

بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته با اضافه کردن معرف الکلی به نام پارادی متیل آمینوبنزآلدئید (معرف کواکس) در صورت وجود اندول ، کمپلکس قرمز رنگی ایجاد می شود. اگر حلقه قرمز رنگی در بالای آبگوشت ایجاد شد، آزمایش اندول مثبت و اگر حلقه زرد رنگ ایجاد شد، آزمایش منفی است . (به ازای هر ۲/۵ml آب پپتونه، ۵ قطره معرف کواکس به محیط اضافه گردد.)

کنترل مثبت	+	E coli
کنترل منفی	-	Enterobacter

۴- کشت محیط MR-VP (متیل رد – وژزپروسکوئر)

یکی از باکتریهای اشریشیاکلی و آنتروباکتر را برداشت نموده و در محیط MR-VP کشت دهید. باسیلهای فامیل آنتروباکتریاسیه از نظر متابولیکی به دو گروه تقسیم می شوند:

1- Mixed acid fermenter
2- Butandiol fermenter

گروه اول مانند E.coli مقادیر فراوانی اسیدهای لاکتیک ، فرمیک ، استیک و سوکسینیک ایجاد می نماید و گروه دوم مانند کلبسیلا و آنتروباکتر مقادیر کمی اسیدهای آلی و مقادیر فراوانی محصولات خنثی ایجاد می نمایند. در آزمایش MR، گروه Mixed acid Fer. را با اضافه کردن معرف متیل رد به محیط تشخیص می دهند. ۵ قطره معرف MR اضافه کرده و سپس تغییر رنگ محیط را مورد بررسی قرار می دهیم.

(کنترل مثبت) رنگ قرمز	+	E.coli

Enterobacter - (کنترل منفی) رنگ زرد)

آزمایش VP(وژزپروسکوئر) حضور استوئین یا استیل متیل کربینول را مشخص می نماید. بعد از مدت انکوباسیون دو محلول آلفا نفتل و پتاس را اضافه نموده و لوله را خوب تکان دهید، تا محیط با اکسیژن مواجه گردد و اگر استوئین در محیط وجود داشته باشد در حضور هوا و KOH به دی استیل اکسیده شده و سپس دی استیل با ترکیبات گوانیدین پپتین واکنش و در حضور آلفانفتل رنگ قرمز تشکل می شود. در تست VP به ازای هر ۲/۵ سی سی ، ۶ قطره از معرف آلفانفتل و ۳ قطره معرف KOH ۴۰٪ اضافه کرده و لوله را تکان می دهیم و پس از ۱۵ دقیقه رنگ محیط را بررسی می نماییم. تستهای منفی را تا ۴۵ دقیقه نگاه می داریم.

E.coli - کنترل منفی (بیرنگ یا قرمز مسی)

Enterobacter + کنترل مثبت (رنگ قرمز)

۵- کشت در محیط اوره (آزمایش اوره آز)

از پروتئوس برداشت کرده و در محیط اوره کشت دهید.

آزمایش اوره آز : این آزمایش براساس توانایی هیدرولیز اوره، در تشخیص باکتریهای هوازی و بی هوازی استفاده می شود. در این محیط اوره و معرف فنل رد وجود دارد. در صورت وجود آنزیم اوره آز، اوره هیدرولیز شده و آمونیاک تولید می گردد. pH محیط قلیایی و در نتیجه ارغوانی یا صورتی پررنگ می شود.

$$O=C(NH_2)(NH_2) + 2H_2O \xrightarrow{\text{urease}} 2NH_3 + Co_2 + H_2O$$

پروتئوس + کنترل مثبت

اشرییشیا کلی - کنترل منفی

۶- کشت پروتئوس در ژلوز ساده در پلیت برای بررسی پدیده سوارمینگ (خزیدن)

از پروتئوس برداشت کرده وبه صورت نقطه ای در گوشه ای از پلیت کشت دهید و پس از زمان انکوباسیون ، پروتئوس در روی محیط کشت خزیده و سطح محیط را می پوشاند.

۷- کشت در محیط حرکت (Motility)

برای بررسی حرکت در باکتریها از محیط نیمه جامد حرکت استفاده می نمایند. فیلاوپلاتین را به صورت نیزه ای در آورده و باکتری را برداشت و تا وسط محیط به صورت خط مستقیم کشت دهید. بعد از انکوباسیون، ایجاد کدورت در اطراف محل خط کشت ، نشان دهندۀ حرکت باکتری است .

E.coli کنترل مثبت کدورت و گسترش از خط کشت

Shigella کنترل منفی عدم کدورت و رشد در راستای خط کشت

ضمناً از روش مستقیم با قرار دادن یک قطره محلول میکروبی بین لام و لامل می توان حرک باکتریهای متحرک را بررسی نمود.

۸- بررسی آزمایش سیترات :

برای تشخیص باسیلهای گرم منفی براساس توانایی باکتری در استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن، از محیطی به نام سیمون سیترات استفاده می شود. این محیط حاوی بافر ، کاتیون ، سیترات و برم تیمول بلو (معرف pH) است.

ارگانیزمهایی که قادرند سیترات را به عنوان تنها منبع کربن استفاده نمایند به وسیلۀ آنزیم سیتراتاز، سیترات را به اگزوالواستات و استات تبدیل نموده و اگزالواستات توسط آنزیم اگزالواستات دکربوکسیلاز به CO_2 و پیروات تبدیل می گردد. CO_2 با سدیم و آب ایجاد بی کربنات سدیم نموده که ترکیبی قلیایی است و در نتیجه pH محیط بالا رفته و معرف از سبز به آبی تیره تغییر رنگ می دهد.

E.Coli - رنگ محیط سبز (کنترل منفی)

(کنترل مثبت)	رنگ محیط آبی	+	Enterobacter

۹- کشت پسودوموناس آئروژینوزا در ژلوز ساده در لوله برای مشاهده پیگمان

از پسودوموناس برداشت کرده و برروی ژلوز ساده در لوله به صورت خطوط زیگزال کشت دهید. این باکتری پیگمانهای مختلفی ترشح می کند از جمله پیوسیانین که آبی رنگ است و فلوئورسئین که زرد مایل به سبز است . این پیگمانها در آب محلولند و روی محیط ژلوز منتشر می شوند و ژس از ۷۲ ساعت محیط را به رنگ آبی مایل به سبز در می آوردند.

باسیلهای گرم منفی غیر تخمیری :

باسیلها و یا کوکوباسیلهای گرم منفی می باشند. جایگاه آنها در طبیعت ، غالباً آب و خاک بوده و برروی مخاط بدن انسان و حیوانات نیز زندگی می کنند. این باکتریها همچنین از محیطهای مرطوب مانند وسایل کمک تنفسی ، حمام ، شیرآب و حتی محلولهای ضد عفونی کننده جدا شده اند. در حضور مواد شیمیایی ضد عفونی کننده قادر به رشد بوده و به علت مقاومت آنتی بیوتیکی از اهمیت خاصی برخوردارند.

مهمترین باکتریهای این گروه عبارتند از : پسودوموناس، اسینتوباکتر، آلکالی ژنز، اکروباکتر، موراکسلا و جنسهایی که با حرف و عدد مشخص می شوند. از مهمترین عوامل شایع در عفونتهای بیمارستانی پسودوموناس ائروژینوزا می باشد.

تشخیص آزمایشگاهی :

باسیلهای گرم منفی غیر تخمیری فاقد اسپور، هوازی و غالباً متحرک می باشد. در شرایط بی هوازی فقط نمونه هایی رشد می کنند که قادر به استفاده از نیترات یا آرژینین به عنوان گیرنده نهایی الکترون باشند.

در بررسی های آزمایشگاهی ، ابتدا باید آنها را از آنتروباکتریاسیه ها تشخیص داد.

آنتروباکتریاسیه ها همگی اکسیداز منفی می باشند ولی در NFB آزمایش اکسیداز مثبت یا منفی است. برای تشخیص جنس باکتری در ابتدا از چند آزمایش استفاده می شود که عبارتند از :

آزمایش اکسیداز، توانایی رشد در محیط مک کانکی آگار، توانایی استفاده از کربوهیدراتها و نوع مسیر متابولیسمی مورد استفاده که طبق جدول صفحه بعد شناسایی صورت می گیرد.

آزمایش OF

یکی از مهمترین صفات مهم برای شناسایی NFB از آنتروباکتریاسیه ها ، توانایی ارگانیسم جدا شده در استفاده از کربوهیدراتها می باشد که با آزمایش OF انجام می گیرد. در این آزمایش از محیطی به نام Oxidative fermentative media که دارای مقادیر بسیار کمی پپتون است استفاده می گردد. اگر چه محیط KIA (و یا TSI) تخمیر و عدم تخمیر قند را نشان می دهد ولی به علت بالا بودن مقدار پپتون در محیط ، مقادیر کم اسید خنثی می شود و بنابراین پاسخ درستی ارائه نمی گردد ولی محیطOF دارای پپتون کمتر و مقدار بیشتری کربوهیدرات است و در نتیجه مقدار کم اسید نیز مشخص می گردد. در ضمن آگار موجود ، از نفوذ اسید به محیط جلوگیری کرده و در نتیجه اسید در سطح باقی می ماند.

برای کشت برروی این دو محیط از دو لوله استفاده می شود. ارگانیسم جدا شده را در هر دو محیط تلقیح کرده و سپس یکی از محیط ها را با پارافین استریل پوشانده که شرایط بی هوازی ایجاد شود. بعد از گرماگذاری در لوله هایی که رنگ زرد ایجاد شده، اسید تولید و گلوکز مصرف شده است. در لوله واجد پارافین (شرایط بی هوازی) عمل تخمیر و در لوله فاقد پارفین (شرایط هوازی) عمل اکسیداسیون صورت می گیرد.

باکتریهای هوازی بیهوازی اختیاری ، در هر دو لوله تغییر رنگ ایجاد می کنند. باکتریهای اکسیداتیو فقط در شرایط هوازی یعنی در محیط بدون پارافین ایجاد اسید کرده می کنند. باکتریهایی که گلوکز را از هیچ یک از طرق فوق مصرف نمی نمایند را غیراکسید کننده می گویند. (شکل ۱)

علاوه بر آزمایشهای گفته شده به منظور تشخیص باکتری، می تـوان از آزمایشـهای دیگـر از جملـه رنگ آمیزی فلاژل ، اوره آز، اندل ، تحـرک ، دکربوکسیلاسـیون و هیـدرولیز اسـیدهای آمینـه و .... استفاده نمود.

جلسه سیزدهم :

آنتروباکتریاسیه ، باسیلهای گرم منفی غیر تخمیری و هلیکوباکترپیلوری

دستور کار :

۱- بررسی و تفسیر نتایج آزمایشهای باسیلهای گرم منفی روده ای مطـابق جـداول منـدرج در جلسهٔ قبل.

۲- مشاهدهٔ آزمایش اکسیداز و ایجاد پیگمان در پسودوموناس آئروجینوزا

۳- تهیه گسترش از اشریشیاکلی و رنگ آمیزی گرم

۴- مشاهده هلیکوباکترپیلوری در گسترش رنگ شده به روش متیلن بلو.

آزمایش اکسیداز:

این آزمایش براساس تعیین آنزیم سیتوکرم اکسیداز C برای تشخیص باکتریهاست.

در تشخیص این آنزیم، از محلولهایی استفاده می شود که در حالت عـادی بـی رنـگ بـوده و بعـد از اکسیده شدن رنگی می شوند. در این آزمایش از معرف اکسـیداز (محلـول تترامتیـل پـارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید) استفاده می شود.

روش کار :

معرف یک درصد اکسیداز را در آب مقطر تهیه می نماییم. سپس قطعه ای از صافی را در یک پلیت قرار داده و با محلول فوق مرطوب می نماییم. بعد با پی پت پاستور از کلنی برداشت کرده و روی کاغذ قرار می دهیم. در صورت ایجاد رنگ ارغوانی در عرض ۵ تا ۱۰ ثانیه آزمایش مثبت است.

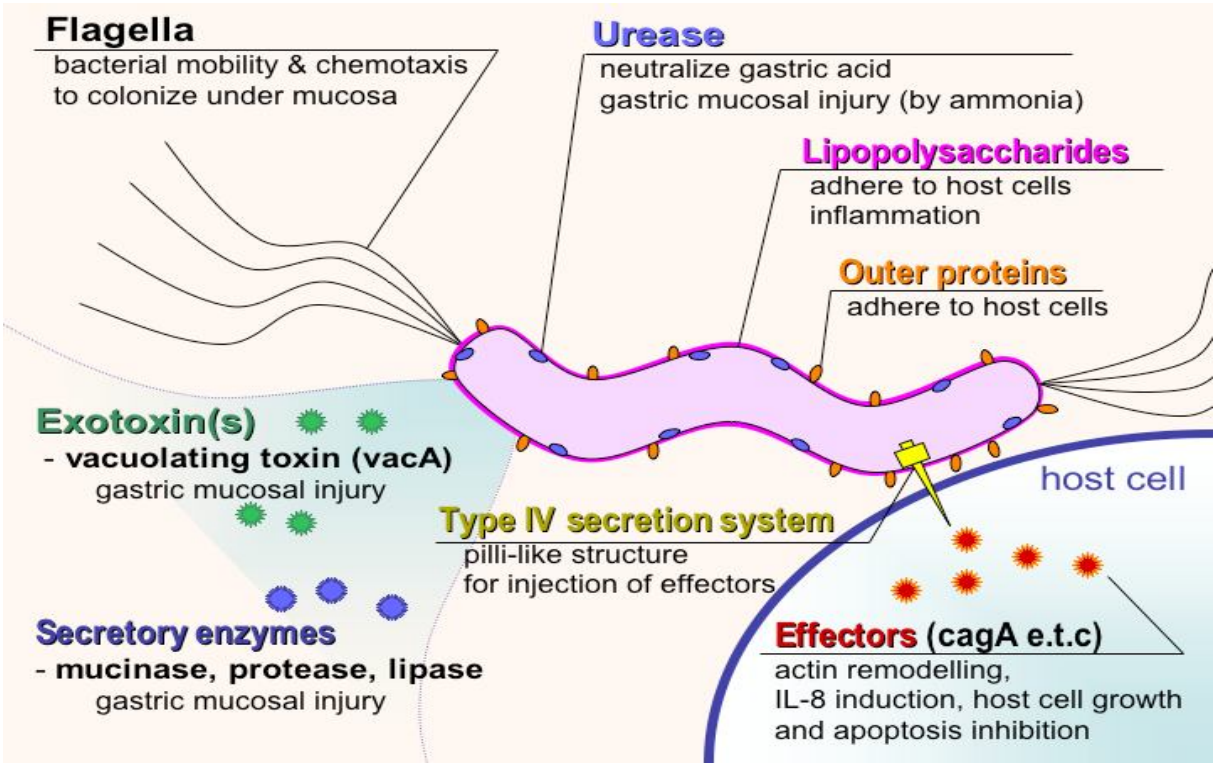
Pseudomonas aeroginosa	+	(کنترل مثبت) رنگ ارغوانی
E. coli	-	(کنترل منفی) بی رنگ

هلیکوباکترپیلوری

یکی از عوامل سببی در ایجاد اختلالات معدی – روده ای (GI) بویژه گاستریت مزمن و اولسرهای پپتیک محسوب می گردد. این باکتری از نظر شکل خصوصاً در نمونه های تهیه شده از بیمار خمیده تا اسپیرال بوده و طولی در حدود ۳ و عرضی در حدود ۰/۵ میکرومتر را دارا می باشد. این باکتری گرم منفی است، هر چند در روش رنگ آمیزی گرم بخوبی رنگ نگرفته و پیشنهاد می گردد برای مشاهده بهتر آن از روش گیمسا و متیلن بلو استفاده نمائیم.

این باکتری دیر رشد بوده و برای بدست آوردن آن بهتر است نمونه بیوپسیتهیه شده از بیمار را پس از مرحله آماده سازی به محیط های کشت جامد غنی شده انتقال داد. از آنجا که این باکتری میکروآئروفیل می باشد لذا پیشنهاد می گردد نمونه حاوی باکتری در چنین شرایطی(۵ تا ۱۰ درصد اکسیژن و ۱۰درصد CO_2) به مدت ۵ تا ۷ روز در حرارت ۳۷$\dot{C}$ گرمخانه قرار گیرد. پرگنه های این باکتری به قطر ۰/۵ تا ۱/۵ میلیمتر، محدب ، براق ، صاف و با اطرافی منظم مشاهده می گردند. با انجام آزمایش های بیوشیمیایی نظیر اوره آز، اکسیداز ، کاتالاز و .... و همچنین از روی حساسیت باکتری به سفالوتین و مقاومت به نالیدیکسیک اسید می توان باکتری را تعیین هویت نمود.

از آنجا که این باکتری دارای فعالیت شدید اوره آزی است لذا از این خاصیت نیـز مـی تـوان جهـت تشخیص سریع باکتری در نمونه های بیوپسی تهیه شده از معده بیمـاران در اطـاق آندسـکپی بهـره جست . ضمناً با توجه به اینکه روش آندسکپی با بروز ناراحتی در بیماران توام مـی باشـد، امـروزه از روشهای دیگر نظیر آزمایش تنفسی اوره (UBT))(براساس سنجش میزان CO_2 رادیواکتیو در بازدم بیمارانی که به آنها اوره با کربن نشانه دار داده شده است) و یا روش هـای سـرولوژیک نظیـر الایـزا، ایمونوفلورسنس و همچنین روشهای ژنتیکی مانند PCR برای تشخیص نیز استفاده می نمایند.



جلسهٔ چهاردهم : ویبریون وبا

دستور عملی:

۱- مطالعه میکروسکوپی ویبریون وبا پس از رنگ آمیزی گسترش به روش گرم

۲- ایزولاسیون ویبریون وبا در محیط اختصاصی (TCBS)

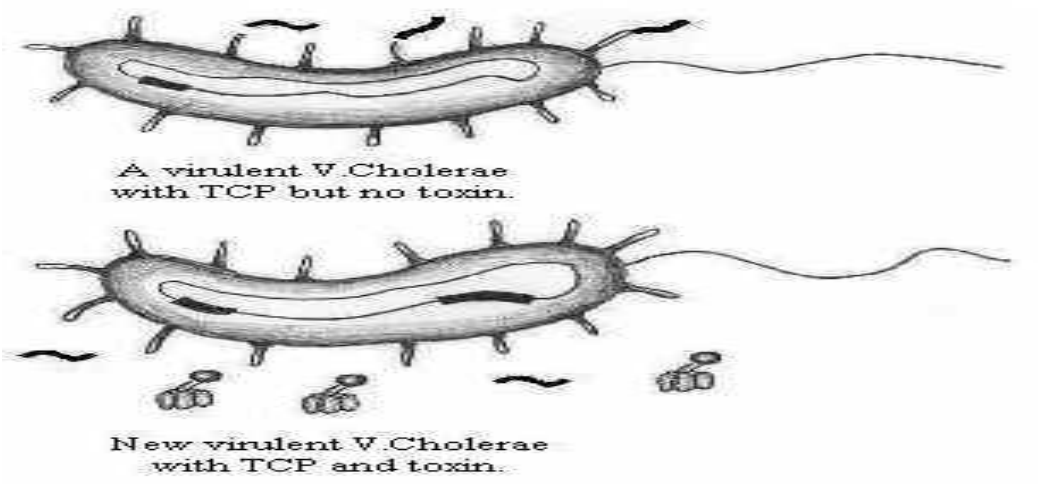
۳- کشت ویبریون وبا در محیط آب پپتونه قلیایی

۴- کشت ویبریون وبا در محیط کلیگلرآیرون آگار

۵- آزمایش اندول

۶- مشاهده میکروسکوپی یرسینیاپستیس

ویبریون وبا باکتری گرم منفی ، خمیده ، بدون اسپور ، دارای فلاژل و شدیداً متحرک است طول آن بین ۰/۵ تا ۲ میکرومتر متغیر بوده و اکسیداز مثبت است.



مناسب ترین روش تشخیص آزمایشگاهی بیماری وبا، کشت مدفوع است. قبل از مصرف آنتی بیوتیک از مدفوع بیمار به کمک رکتال سواب برداشت نموده و ابتدا مدفوع را در محیط غنی کننده آب پپتونه با pH = ۸/۶ کشت می دهند. پس از ۸ ساعت پرده ای در سطح محیط مشاهده می گردد. از این محیط برداشت نموده و روی محیط انتخابی TCBS کشت می دهند.

ویبریون وبا روی این محیط کلنی های زرد رنگ می دهد. از این پَرگنه ها برداشت و روی محیط کلیگلر کشت می دهند. ویبریون وبا گلوکز را بدون ایجاد گاز تخمیر می کند و لاکتوز آن منفی است. آزمایش آگلوتیناسیون ابتدا با آنتی سرم پلی والان و سپس با آنتی سرمهای اینابا و اوگاوا انجام می گیرد. چنانچه با آنتی سرمهای پلی والان و اینابا جواب مثبت داد نوع اینابا ، اگر با آنتی سرمهای پلی والان و اوگاوا جواب مثبت داد نوع اوگاوا و چنانچه با هر دو نوع آنتی سرم اینابا و اوگاوا جواب مثبت داد نوع هیکوجیما می باشد.

جهت تأیید تشخیص از آزمایش اندول و VP، آگلوتیناسیون گلبول قرمز مرغ ، تعیین حساسیت به پلی میکسین B و فاژ۴ موکرجی استفاده می نمایند.

اساس و روش کار :

۱- رنگ آمیزی گسترش وبا به روش گرم و مشاهدهٔ ویبریونهای گرم منفی (صورتی رنگ)

۲- از ویبریون وبا برداشت و برروی محیط TCBS به روش ایزولاسیون کشت دهید.

* محیط تیوسولفات سیترات بایل سالت سوکروز آگار (TCBS) محیطی است اختصاصی برای کشت ویبریوکلره و دیگر ویبریون های پاتوژن در نمونه های مدفوع ، این محیط حاوی پروتئین ، عصارهٔ مخمر، سوکروز، املاح و نمکهای صفراوی ، آگار و دو معرف برم تیمول بلو و تیمول بلو است.

ویبریونهای پاتوژن درpH نزدیک ۸ بهتررشد کرده ودر شرایط اسیدی محیط به سرعت می میرند و در حضور نمگهای صفراوی و کلرور سدیم بخوبی رشد می نمایند.

انتخابی بودن محیط به علت وجود pH حدود ۸/٦ و نمکهای صفراوی است که از رشد باکتریهای گرم مثبت و بدون اسپور و بسیاری از گونه های لاکتوز مثبت فلور نرمال روده و پروتئوس و پسودوموناسها جلوگیری می کند.

۳- از ویبریون وبا برداشت کرده و در محیط آب پپتونه قلیایی کشت دهید. برای انجام آزمایش اندول طبق روشی که در صفحهٔ ٦٦ آمده است عمل کنید.

۴- از ویبریون وبا برداشت و در عمق و سطح محیط کلیگرایرون آگارّ کشت دهید.

واکنش در محیط به صورت Alkaline/Acid بدون گاز و SH_2 است.

آزمایشهای جداسازی ویبریون وبا بیوتیپ التور از کلاسیک

۱- آزمایش VP:

ویبر یون وبا بیوتیپ التور VP مثبت می باشد. در صورتیکه ویبریون کلرای کلاسیک منفی است. جهت مطالعه روش آزمایش به مبحث انتروباکتریاسیه مراجعه شود.

۲-آگلوتیناسیون گلبول قرمز مرغ :

برای انجام این آزمایش محلول غلیظی از سرم فیزیولوژی و باکتری تهیه نموده و یک قطره از آن را روی لام قرار می دهند و یک قطره از سوسپانسیون ۵-۲ درصد گلبول قرمز مرغ روی آن می ریزند.

هماگلوتیناسیون بیوتیپ التور مثبت ولی در بیوتیپ کلاسیک منفیاست.

۳- تعیین حساسیت به پلی میکسین B:

ویبریون التور به پلی میکسین B مقاوم و کلاسیک حساس می باشد.

۴- تعیین حساسیت به فاژ IV موکرجی:

یکی دیگر از طرق تشخیص افتراقی ویبریون التور از کلاسیک حساسیت به فاز ٤ موکرجی است، که ویبریون وبا بیوتیپ التور نسبت به آن مقاوم و بیوتیپ کلاسیک به آن حساس است.

۵- تعیین حساسیت به فاژ V:

ویبریون وبا بیوتیپ التور حساس و بیوتیپ کلاسیک مقاوم است.

مشاهدهٔ میکروسکوپی یرسینیاپستیس :

یرسینیاپستیس عامل طاعون باسیلی گرم منفی و غیر متحرک است که معمولاً به صورت تک تک و یا جفت و گاهی به صورت زنجیره های کوتاه مشاهده می گردد. در رنگ آمیزی با رنگهای پلی کروم مثل گیمسا یا Wayson دو انتهایش بیشتر رنگ می گیرد. در کشت تازه و یا در نسج در اطراف باکتری کپسول مشاهده می شود.

لام مورد مطالعه در کلاس به روش متیلن بلو رنگ آمیزی گردیده و باسیلها به رنگ آبی و دو قطبی رنگ گرفته اند. (شبیه به سنجاق قفلی)

جلسهٔ پانزدهم : بروسلا و هموفیلوس

دستور کار:

۱- آزمایش میکروسکوپی بروسلاپس از رنگ آمیزی گسترش به روش گرم

۲- مشاهدهٔ پرگنه های بروسلا روی محیط ژلوز خوندار

۳- مشاهدهٔ آزمایش اوره آز در بروسلاها

۴- مشاهدهٔ تولید SH_2 بوسیله بروسلاها

۵- مشاهدهٔ میکروسکوپی هموفیلوس دوکری (H.ducryr)

۶- تفسیر آزمایشهای جلسه قبل.

بروسلاها کوکوباسیلهای گرم منفی به قطر ۰/۴ میکرون ،غیرمتحرک ، بدون کپسول و بدون اسپور هستند. برای حیوانات بیماریزا بوده و در حیوانات اهلی موجب سقط جنین می گردد. در انسان ایجاد بیماری تب مالت می کند. بروسلاها دارای سه گونه مهم می باشند که برحسب میزبان وابسته نامگذاری می شوند.

الف – بروسلا ملی تنسیس که بخصوص برای بز و گوسفند بیماریزا است.

ب – بروسلا آبورتوس که باعث عفونت در گاو می شود.

ج – بروسلاسوئیس که خوک را آلوده می کند ولی انسان و حیوانات مزبور ، نسبت به هر سه نوع حساس می باشند. سه نوع عمدهٔ بروسلا را می توان از روی اختلافاتی که در حساسیت نسبت به بعضی از رنگها، احتیاج به CO_2 برای رشد، تجزیه اوره و ایجاد SH_2 ، دارند متمایز نمود. حساسیت انواع سه گانه بروسلا، به رنگهای آنیلینی مثل تیونین و فوشین متفاوت می باشد. بطوریکه بروسلا ملی تن سیس روی محیط حاوی فوشین و تیونین رشد می کند. (به جز رقت $\frac{۱}{۲۵۰۰۰}$ تیونین) در حالیکه اغلب سویه های بروسلا آبورتوس روی محیط فوشین دار و بیشتر سویه های بروسلا سوئیس در رقت $\frac{۱}{۵۰۰۰۰}$ و $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$ محیط تیونین دار رشد می کنند.

این رنگها را به نسبت $\frac{۱}{۲۵۰۰۰}$ ، $\frac{۱}{۵۰۰۰۰}$ و $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$ در مورد تیونین و $\frac{۱}{۵۰۰۰۰}$ و $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$ در مورد فوشین به محیط اضافه می کنند (مطابق جدول صفحه بعد)

بروسلا آبورتوس وقتی تازه از بدن بیمار جدا می گردد احتیاج به ۳ تا ۱۰ درصد CO_2 دارد. بروسلاسوئیس اوره را در مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه تجزیه می کند در حالیکه بروسلا ملی تنسیس متغیر بوده و بروسلاآبورتوس در مدت ۱۲۰ دقیقه یا بیشتر اوره را تجزیه می نماید. بروسلاسوئیس آمریکایی به شدت ایجاد هیدروژن سولفوره می کند. در حالیکه بروسلا ملی تن سیس ایجاد SH_2 نمی کند و بروسلا آبورتوس مقدار جزئی SH_2 ایجاد می کند.

بررسی تولید. H_{25} در بروسلاها

به این منظور باکتری را در سطح محیط غنی مانند بروسلا آگار کشت داده و نوار کاغذی آغشته به استات سرب ۱۰٪ را در دهانه لوله قرار می دهند. بعد از انکوباسیون در ۳۷°C ، در صورت تولید H_{25} ، گاز حاصله با سرب ترکیب و ایجاد سولفور سرب سیاه رنگ می کند که موجب ایجاد رنگ سیاه در انتهای کاغذ می گردد.

بروسلاژلاتین را ذوب نمی کند، کاتالاز مثبت بوده و نیتراتها را احیا می نماید. بروسلا آبورتوس و سوئیس عمل احیا را تا ایجاد گاز ازت پیش می برند. بروسلاها روی محیطهای محتوی سرم و گلوکز بخوبی رشد کرده و پرگنه ها پس از چند روز ظاهر می شوند که شفاف و درخشان و به قطر یک میلی متر می باشند.

یکی از محیطهای مناسب است جهت کشت خون استفاده از محیط دی فازیک کاستاندا (Castaneda) است.

هموفیلوس :

این جنس شامل کوکوباسیلهای گرم منفی به طول تقریبی ۱/۵ میکرومتر، بی حرکت و بدون اسپور است که گاه به صورت زنجیره های کوتاه دنبال هم قرار می گیرند. مرفولوژی باکتری تا حدود زیادی به نوع و محیط کشت و سن آن بستگی دارد. این ارگانیزمها در کشتهای جوان در محیط های غنی دارای کپسول مشخصی می باشند. به طوریکه برای تعیین نوع هموفیلوس آنفلوانزا از آزمایش تورم کپسول استفاده می شود. تشخیص این ارگانیزمها تا حدی بستگی به اثبات نیاز این باکتریها به فاکتورهای رشد مرسوم به x و v دارد. دو باکتری هموفیلوس آنفلوانزا نوع B و هموفیلوس دوکری از اهمیت پزشکی بیشتری برخوردارند.

هموفیلوس دوکره ای: این باکتری عامل بیماری مقاربتی شانکروئید (شانکرنرم) در انسان می باشد. باسیلی فوق العاده کوچک به طول ۱/۱ تا ۱/۵ میکرومتر و عرض ۰/۵ تا ۰/۶ میکرومتر می باشد. در گسترشهایی که از ضایعات بیمار گرفته می شود، باکتریها، تک تک یا به صورت توده های کوچک و گاه به صورت دستجات موازی قرار می گیرند. اشکال داخل و خارج سلولی هر دو مشاهده می گردد. بهترین محیط کشت برای آن محیط خون لخته شده تازه خرگوش ، گوسفند یا انسان است که به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۵۵$\mathring{C}$ قرار گرفته است. در لام مورد مشاهده کوکوباسیلهای هموفیلوس دوکری با رنگ آمیزی بلودومتیلن به رنگ آبی با دو انتهای پررنگ به همراه گلبولهای سفید چند هسته ای دیده می شوند.