عنوان دوره آموزشی

اصول پایه میکروب شناسی و کنترل کیفی

بهار ۱۴۰۰

بسم الله الرحمن الرحيم

گروه‌های هدف

تکنسین، کاردان و کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی
هدف کلی: افزایش دانش و آگاهی پرسنل در مورد اصول پایه میکروب شناسی و کنترل کیفی

روش و نحوه اجرای آموزش
با توجه به اینکه هدف این مجموعه آموزشی افزایش دانش و آگاهی در مورد اصول اصول پایه میکروب شناسی و کنترل کیفی در آزمایشگاه می‌باشد بنابراین می‌تواند جهت ارائه بهتر مطالب به روش حضوری در قالب کارگاه آموزشی و عملی ارائه شود و یا جهت پوشش تعداد بیشتری از آموزش گیرندگان بصورت غیرحضوری و در قالب کتاب‌خوانی انجام گیرد.

مدت دوره آموزشی: ۱۰ساعت

ارزشیابی
در پایان دوره بمنظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش گیرندگان و بهبود مستمر فرایند، یک ارزشیابی از شرکت‌کنندگان به صورت تست‌های چهار گزینه‌ای بعمل خواهد آمد.

فهرست

محیط ها و روش های کشت ۶
مقدمه: ۶
انواع محیط کشت از نظر شکل ظاهری (فیزیکی) ۶
انواع محیط کشت از نظرویژگی های بیوشیمیایی: ۷
اصول کلی تهیه محیط های کشت:..... ۹
شرایط محیط کشت: ۱۰
روش های کشت باکتری ۱۰
تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت ۱۳
روش های تهیه گسترش و رنگ آمیزی..... ۲۶
مطالعه باکتری: ۲۶
۱- انتقال باکتری بر روی لام: ۲۶
الف- برداشت از محیط مایع: ۲۶
ب- برداشت از محیط جامد:..... ۲۷
۲- خشک کردن (Drying)..... ۲۷
۳- ثابت کردن (Fixation) : ۲۷
۴- رنگ آمیزی (Staining): ۲۸
الف- رنگ آمیزی ساده :..... ۲۸
مکانیسم رنگ آمیزی گرم: ۲۹
ترکیبات رنگ آمیزی گرم: ۳۰
کریستال ویوله: رنگ اولیه یا رنگ اصلی ۳۰
روش کار:..... ۳۰
دستورالعمل رنگ آمیزی گرم ۳۱
آزمایش های سنجش حساسیت باکتری بیماری زا نسبت به داروهای ضد میکروبی ۴۳
مصرف سیترات توسط باکتری ها..... ۵۴
DNase Test Agar ۵۵
بررسی توانائی ذوب ژلاتین توسط باکتری ها..... ۵۸
Kligler Iron Agar ۶۰

بررسی حرکت باکتری ها ۶۳
Methyl Red Test ۶۶
فنیل آلانین دآمیناز ۶۸
PYR ۶۹
حساسیت به باسیتراسین و SXT ۷۱
محیط TCBS Agar ۷۳
Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar) ۷۵
اوره آز ۷۸

محیط ها و روش های کشت

۱- انواع محیط های کشت از نظر ویژگی های فیزیکی

۲- انواع محیط های کشت از نظر ویژگی های بیوشیمیایی

۳- اصول تهیه محیط های کشت

۴-آشنایی با روش کشت باکتری ها

مقدمه:

میکروارگانیسم‌ها همانند تمام موجودات زنده برای انجام کارکردهای زیستی خود به مواد غذایی نیاز دارند و در نتیجه باید شرایط مناسب رشد و نمو آنها را فراهم کرده و در محیط‌های ویژه ای تکثیر داده شوند. هنگامی که باکتری ها در شرایط مناسب تکثیر داده شوند گفته می‌شود که باکتری ها کشت داده شده اند. محیط کشت ترکیبی از مواد خاص است که در آن نیازهای غذایی باکتری از نظر منبع کربن، انرژی، نیتروژن و هر نوع عامل رشد دیگر در نظر گرفته شده است. امروزه بر حسب نوع باکتری انواع گوناگونی از محیط های کشت با ترکیبات متفاوت برای استفاده در آزمایشگاه-های میکروبیولوژی تهیه می شود. لازم به ذکر است که برای شناسایی عامل بیماری از میکروارگانیسم یک کشت خالص به دست آورد. پس از تهیه کشت های خالص، بررسی‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و همچنین مطالعه صفت‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک میکروارگانیسم جهت شناسایی آن انجام می‌گیرد.

انواع محیط کشت از نظر شکل ظاهری (فیزیکی)

محیط‌های کشت از نظر ویژگی‌های فیزیکی به چهار دسته تقسیم می‌شوند:

الف- محیط‌های کشت جامد (Solid Media): این محیط‌ها دارای یک ماده سفت کننده به نام آگار (Agar) هستند. آگار کربوهیدرات غیر قابل متابولیسم و کلوئیدی است و از نوعی جلبک دریایی به نام ژلیدیوم به دست آمده و به مقدار ۱۲-۱۵gr/lit به محیط جامد افزوده می شود. این ماده در حرارت ۱۰۰-۸۰ درجه سانتی گراد در آب حل

شده و در حرارت های پایین تر از C۴۵ جامد می شود. این محیط ها کاربرد فراوانی دارند و می توان آنها را در لوله و یا پلیت تقسیم کرد. از محیط های جامد روتین می توان به محیط های نوترینت آگار (Nutrient Agar = NA) و مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar) MHA اشاره کرد.

ب- محیط های کشت نیمه جامد (Semi Solid Media): مقدار آگار این محیط ۲-۵gr/lit است و در بیشتر موارد جهت بررسی حرکت باکتری به کار می رود. مانند محیط SIM

پ- محیط های کشت مایع یا براث (Liquid Media): این محیط ها آگار نداشته ، در هر درجه حرارتی مایع بوده و فقط در لوله استفاده می شوند مانند محیط نوترینت براث (NB)،برین هارت اینفیوژن براث Brain Heart Infusion Broth) BHI)، مولر هینتون براث (Muller Hinton Broth)

ت- محیط های کشت دوفازی (Biphasic): مانند محیط کشت کاستاندا(Castaneda) که جهت کشت باکتری هایی مانند بروسلا به کار می رود. این محیط ها از یک فاز جامد آگار ٪۲,۵ به صورت اسلنت و یک فاز مایع تشکیل شده اند. هر دو فاز مایع و جامد در این محیط ها از یک ترکیب ساخته می شود، مانند BHI آگار و BHI براث و یا بروسلا آگار و بروسلا براث.

انواع محیط کشت از نظرویژگی های بیوشیمیایی:

الف- محیط های کشت پایه (Basic Media): این دسته محیط ها دارای کمترین غلظت از ترکیبات اساسی برای رشد باکتری ها هستند مانند محیط های نوترینت آگار، BHIA و (TSATrypticase Soy Agar)، که برای رشد باکتری با نیاز غذایی معمولی مناسب می باشد.

ب- محیط های کشت غنی شده (Enriched Media): به محیط پایه ترکیباتی مانند خون، عصاره مخمر و ... اضافه می شود تا غنی تر شود. از جمله این محیط ها می توان از محیط بلاد آگار(blood agar) و شکلات آگار که به آنها خون افزوده شده، نام برد.

پ- *محیط کشت غنی کننده (Enrichment Media) :* محیط پایه دارای ترکیباتی است که می تواند رشد تعداد اندک میکروارگانیسم پاتوژن را در بین تعداد بسیاری از میکروفلور نرمال ترغیب و تشویق نماید، مانند محیط (Selenit F) که در مورد نمونه مدفوع رشد تعداد اندک پاتوژن های دستگاه گوارش را ترغیب و رشد تعداد بسیار زیاد میکروفلور دستگاه گوارش موجود در نمونه مدفوع را تضعیف می نماید به گونه ای که بتوان به راحتی عامل بیماری را تشخیص داد.

ت- *محیط های کشت انتخابی (Selective Media):* این محیط ها موادی دارند که از رشد بسیاری از باکتری ها جلوگیری کرده و تنها به باکتری های ویژه ای اجازه رشد می دهند مانند محیط کشت مانیتول سالت آگار (Mannitol Salt Agar) که دارای قند مانیتول و ۷,۵٪ کلرید سدیم می باشد و فقط باکتری هایی می توانند در چنین محیطی رشد کنند که بتوانند در مقابل این غلظت کلرید سدیم مقاوم باشند. استافیلوکوکوس روی این محیط به خوبی رشد کرده و بدین ترتیب از سایر باکتری ها متمایز می گردند. مثال دیگر محیط کشت S.S.A (سالمونلا- شیگلا) است که برای جدا کردن سالمونلا و شیگلا از سایر باکتری ها به کار می رود.

ث- *محیط های کشت افتراقی (Differential Media):* به علت داشتن ترکیباتی ویژه، کلنی باکتری های مختلف را از یکدیگر متمایز می سازند. از این دسته می توان از محیط کشت مک کانکی آگار (MacConkey) و ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) که دارای لاکتوز و معرف شیمیایی هستند نام برد. اگر اشریشیا کلای و انتروباکتر را در روی محیط نوترینت آگار کشت دهیم هر دوی آنها، کلنی سفید متمایل به خاکستری را تولید می کنند اما چنان چه در روی محیط ائوزین متلین بلو آگار کشت دهیم اشریشیا کلای کلنی سیاه با درخشش فلزی و انتروباکتر ایجاد کلنی صورتی رنگ می کند.

ج- *محیط های کشت انتقالی (Transport Media):* در مواردی که بین نمونه برداری و کشت نمونه فاصله زمانی وجود دارد از محیط ترانسپورت استفاده می شود. این محیط ها بافرهای نمکی هستند که باکتری را زنده نگه می دارند بدون اینکه تکثیر پیدا کنند مانند محیط استوارت (Stuart medium) و یا محیط کری بلر (Cary & Blair medium).

د- محیط های بیوشیمیایی: با استفاده از این محیط ها، می توان باکتری ها را بر اساس خواص بیوشیمیایی گوناگون مانند تخمیر قندها، نوع منبع کربن، حرکت، تولید گاز، ذوب ژلاتین و غیره شناسایی کنیم. برای نمونه محیط (TSI Triple Sugar Iron agar) محیطی است که دارای چند قند و معرف رنگی است که همه باکتری های عضو خانواده انتروباکتریاسه روی آن رشد می کنند و انواع آنها را بر حسب منظره ایجاد شده (تغییر رنگ محیط در اثر تخمیر قند) می توان تشخیص داد.

اصول کلی تهیه محیط های کشت:

تهیه و آماده سازی محیط های کشت روش های مختلفی دارد. لازم به ذکر است که برای تهیه محیط های کشت باید بر اساس روش های که بر روی ظروف دارای محیط کشت چاپ شده است عمل شود.

الف- محیط کشت مایع: بر اساس روش روی ظرف دارای محیط کشت مقدار معینی از پودر آماده را بر حسب حجم مورد نیاز در آب مقطر حل کرده و در لوله های آزمایش به مقدار لازم تقسیم شده و سپس لوله ها برای استریل شدن اتوکلاو می شوند. لوله های حاوی محیط کشت استریل را می توان مدتی در یخچال نگهداری کرد.

ب- محیط کشت جامد: مطابق دستور روی ظرف دارای محیط کشت، مقداری از پودر آماده را در حجم مورد نیاز آب مقطر حل کرده سپس آن را حرارت داده و هنگامی که محیط کشت کاملاً شفاف شد آن را اتوکلاو می کنند برای تقسیم محیط کشت در پلیت ها پس از اتوکلاو محیط کشت را تا ۴۵□C خنک می کنند. سپس بسته به حجم پلیت ۱۵-۱۲ میلی لیتر از محیط کشت را درون پلیت استریل ریخته، در آن را می بندیم تا سرد و جامد گردد. اگر بخواهیم محیط کشت جامد را در لوله استفاده نماییم ابتدا محیط کشت را در لوله ها تقسیم نموده و سپس اتوکلاو می نماییم.

نکته:

لازم به ذکر است که برای تهیه برخی از محیط های کشت حرارت دادن لازم نیست و برای تهیه برخی محیط های کشت مانند اوره جهت استریل کردن از اتوکلاو استفاده نمی شود بلکه به روش فیلتر کردن استریل می شود.

پ- محیط کشت جامد شیب دار (Slant): در این روش محیط کشت را قبل از جامد شدن بر حسب اندازه لوله آزمایش و یا بطری های مخصوص کشت، در داخل ظرف ریخته و پس از استریل کردن به طور مایل در محلی از آزمایشگاه قرار می دهیم بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه محیط کشت جامد می شود.

شرایط محیط کشت:

در تهیه محیط کشت نکات زیر باید رعایت شود:

۱- محیط کشت باید دارای انواع مختلف و مقادیر کافی از مواد غذایی جهت تأمین انرژی و رشد باکتری باشد.

۲- PH محیط کشت برای باکتری مورد نظر مناسب باشد.

۳- غلظت محیط کشت جهت رشد باکتری مناسب باشد.

۴- هنگام استریل کردن محیط کشت باید دقت کافی به عمل آورد تا ارزش غذایی آن از بین نرود.

روش های کشت باکتری

برای بررسی باکتری ها لازم است آنها را کشت داده و برای شناسایی عامل اصلی بیماری و تأثیر داروهای ضد میکروبی و یا شمارش باکتری ها در ترکیبات و مواد غذایی لازم است میکروارگانیسم را به صورت یک گروه همگن (ایزوله) جدا نمود. برای این منظور روش های مختلفی برای کشت باکتری ها ابداع شده است.

به طور کلی کشت باکتری ها و یا انتقال آنها از یک محیط کشت به محیط دیگر در دو مرحله انجام می شود.

الف) برداشت از محیط نخستین

ب) انتقال به محیط بعدی

نکته مهم در طی مراحل کشت و پاساژ دادن باکتری ها رعایت شرایط آسپتیک است تا از آلودگی باکتری مورد مطالعه توسط باکتری ها و قارچ های موجود در محیط جلوگیری شود.

روش های کشت دادن:

۱- روش های کشت در محیط های مایع: در این روش با استفاده از لوپ و یا در برخی از موارد که از نمونه کلینیکی برداشت شود با استفاده از سواب، نمونه باکتری را به محیط مایع دیگر (در مجاورت شعله) انتقال داده و پس از چند بار وارد کردن سر لوپ به محیط کشت، نمونه انتقال داده می شود. کشت در محیط های مایع بیشتر جهت تکثیر و یا بررسی ویژگی های بیوشیمیائی باکتری ها استفاده می شود.

۲- کشت در محیط های جامد لوله ای شیب دار (Slant):

در این گونه محیط ها می توان باکتری را در سطح و یا در سطح و عمق کشت داد. اگر هدف تنها کشت باکتری در سطح محیط مورد نظر باشد (همچون فنیل آلانین دآمیناز) می توان به وسیله لوپ یا نیدل از نمونه میکروبی برداشت کرده و به صورت زیگزاگ در سطح محیط کشت پاساژ داد.

اگر کشت در عمق محیط نیز مد نظر باشد، با استفاده از نیدل سیم را در عمق محیط (تا یک سانتی متر فاصله از ته لوله) فرو برده و سپس در سطح محیط به صورت زیگزاگ کشت می دهیم.

۳- محیط های نیمه جامد: در این روش با استفاده از نیدل کلنی باکتری را برداشته و تا نزدیکی عمق محیط را به صورت عمودی کشت می دهیم. این محیط ها جهت بررسی ویژگی های بیوشیمیائی یا فیزیولوژیک باکتری (حرکت باکتری) استفاده می شود. مانند محیط SIM و OF

۴- محیط های جامد در پتری دیش: هدف کشت در محیط های جامد در پلیت، جدا کردن و به دست آوردن تک کلنی از باکتری ها، شمارش باکتری ها و بررسی تأثیر مواد شیمیایی بر آنها است. هر کلنی باکتریایی مجموعه ای از تعداد زیادی باکتری است که از تکثیر یک باکتری تک (Clone) بوجود آمده اند پس دارای ویژگی های مشترک ژنتیکی و بیوشیمیائی هستند. برای شناسایی باکتری ها لازم است برای نخستین قدم یک کلنی باکتری را از یک مجموعه جنس ها و گونه های گوناگون باکتری جداسازی و خالص کرد. برای این منظور از روش کشت Streak استفاده می شود.

Streak plate method:

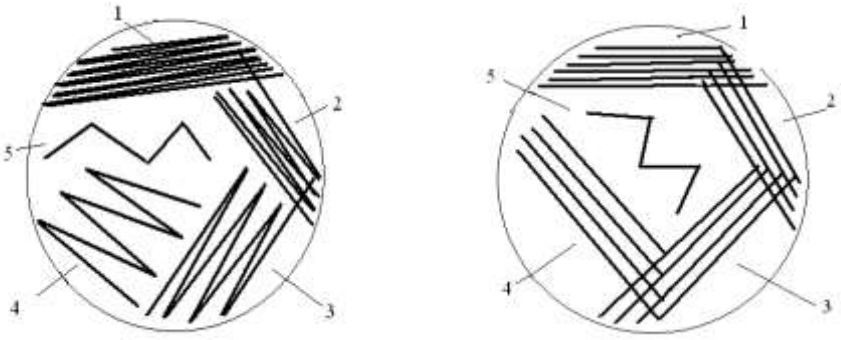
یکی از متداول ترین روش های تهیه کشت خالص و تهیه تک کلنی روش Streak Plate method است. در این روش پس از برداشت نمونه با استفاده از لوپ در شرایط آسپتیک، پلیت به چهار قسمت فرضی تقسیم می گردد:

۱- نخست باکتری را در منطقه ۱ به صورت خطوط شکسته پخش می شود.

۲- لوپ را با شعله استریل و پس از سرد شدن پلیت را ۹۰ درجه چرخانده منطقه ۲ به گونه ای کشت داده می شود که با وارد کردن لوپ یک یا دو بار در منطقه ۱ بدون اینکه دست برداشته شود به صورت خطوط زیگزاگ (خطوط در همدیگر وارد نشود) منطقه ۲ کشت داده می شود.

۳- دو مرتبه لوپ را استریل کرده و پلیت را ۹۰ درجه چرخانده و لوپ را همانند مرحله قبل یک یا دو بار وارد منطقه ۲ کرده و خطوط شکسته در منطقه ۳ تکرار می شود.

۴- در مرحله چهارم لوپ را استریل نکرده و پس از برداشتن دست و چرخاندن ۹۰ درجه ای پلیت، ناحیه ۴ را به صورت خطوط زیگزاگ کشت داده و در پایان در منطقه وسط که خالی مانده ۲-۱ خط S مانند با لوپ کشیده می شود (بدون تماس این خطوط با خطوط قبلی). در این روش انتظار می رود در هر مرحله تعداد باکتری های کمتری به ناحیه بعدی انتقال یافته و در نهایت در نواحی انتهائی (۳، ۴ و وسط) باکتری به صورت تک قرار گرفته که پس از انکوباسیون، کلنی های تکی از هر باکتری بدست آید.



Streak plate method

تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت

مقدمه:

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگاه میکروب شناسی ایفا می کنند و به طور گسترده ای برای جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت میکروارگانیسم های بیماری زا به کار می روند. بسیاری از آزمایشگاه ها به طور روتین محیط های کشت مورد نیاز برای مصارف تشخیصی و تحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. برای اطمینان از این که محیط های کشت، کیفیت خوب و نتایج مطلوبی دارند، باید روش های کنترل کیفی مناسبی به کار گرفته شود. برای رسیدن به این هدف باید در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای ذیل در نظر گرفته شود.

آب مصرفی:

کیفیت محیط های کشت بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت بکار می‌رود. سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و PH می باشد. در شرایط ایده آل یونهای مس بدلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها نباید در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد. قدرت هدایت الکتریکی آب باید کمتر از ۱۵ میکرو زیمنس باشد وهمچنین PH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

توزین محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روی قوطی نصب گردیده است، مقدار مناسبی از پودر محیط کشت را با دقت وزن نمایید. ظرف محیط کشت را دور از کوران هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهایی که دارای مواد سمی هستند و تماس طولانی مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ایجاد توده ای از غبار وزن کنید. هرچه زودتر درب ظرف را ببندید.

نصف حجم آب مورد نیاز را داخل ظرف بریزید. سپس مقدار وزن شده محیط کشت را به آن اضافه نمایید. برای چند دقیقه به تندی تکان دهید. باقیمانده آب را به دیواره ظرف بریزید تا ذرات محیط کشت چسبیده به دیواره نیز

وارد محلول شوند. این مرحله بسیار مهم است، چون پودر خشک محیط کشت در بالای سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استریل نشود و منبع آلودگی گردد.

حل کردن محیط کشت:

محیط های کشت بدون آگار، معمولا با تکان دادن آهسته و ملایم حل خواهند شد. اما محیط های کشت حاوی آگار باید قبل از حرارت دادن به مدت چند دقیقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکالو کردن، حل شود. محیط های کشت را بجوشانید بدون آنکه بسوزند. محیط های کشتی که نباید اتوکالو شوند، بعد از این مقدار حرارت دادن، برای تقسیم داخل پلیت ها یا ظروف استریل دیگر آماده خواهند بود. توصیه می شود استریلیزاسیون نهایی در دمای C^{o}۱۲۱، به مدت ۱۵ دقیقه برای لوله ها و بطری های کوچک حاوی حدود ML ۱۰ محیط کشت، ۲۰ دقیقه برای ارلن های حاوی ۵۰۰ ML محیط کشت، ۲۵ دقیقه برای ارلن های حاوی ML ۱۰۰۰ محیط کشت، و ۳۰ دقیقه برای ارلن های حاوی ۲۰۰۰ ML محیط کشت باشد.

اندازه گیری و تنظیم PH:

محیط های کشت دهیدراته اگر بطور مناسب تهیه شوند نیازی به تنظیم pH ندارند. pH نهایی محصول استریل شده را می توان روی پلیت یا بطری اندازه گیری کرد، اما باید آنها را بعد از سنجش pH دور ریخت. بنابراین بعد از استریل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دمای C ˚۲۵، مقدار pH را در حد مورد نظر (۰/۲ ±) تنظیم نمایید. تنظیم pH معمولا با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) و یا با استفاده از اسید کلریدریک ۳۶/۵ گرم در لیتر (تقریباً یک مولار) انجام می شود.

توزیع:

محیط کشت را در ظرفی مناسب با حجم ۲ تا ۳ برابر حجم محیط کشت بریزید تا بتوانید آنرا به خوبی تکان دهید و مخلوط کنید.

استریلیزاسیون:

بعضی از محیط های کشت به استریلیزاسیون با اتوکلاو احتیاجی نداشته و با جوشاندن استریل می شوند که دستور ساخت آنها بر روی برچسب قوطی محیط کشت قید گردیده است. استریلیزاسیون سایر محیط های کشت توسط

حرارت مرطوب یا صافی غشایی انجام می گردد که این موارد نیز بر روی بر چسب قوطی محیط کشت قید گردیده است.

الف) استریلیزاسیون با حرارت مرطوب:

استریلیزاسیون محیط کشت تا حجم یک لیتر، در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱ $^{\circ}$C (فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتیمترمربع) انجام می‌گیرد. برای حجم های بیشتر از یک لیتر باید چرخه استریلیزاسیون را بطور مناسب تغییر داد. اما چون اکثر مشکلات در استریلیزاسیون محیط های کشت وقتی رخ می‌دهد که مقادیر بیشتر از دو لیتر محیط کشت باید استریل شود، لذا توصیه می‌شود که مقادیر زیاد محیط کشت را در حجم های کوچکتر تقسیم نمایید.

کنترلی کیفی اتوکلاو ، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی TST استفاده می‌کنند. از اندیکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارائی اتوکلاو استفاده می‌کنند اسپور Bacillus Stearothermophilus را می‌توان نام برد که بصورت تجاری قابل دسترس می باشد.

ب) استریلیزاسیون با صافی غشایی:

از صافی غشایی برای استریل کردن محیط های کشت و ترکیبات حساس به حرارت استفاده می شود. استریلیزاسیون بوسیله صافی غشایی تحت شرایط خلاء یا افزایش فشار انجام می پذیرد. از غشاء ها و صافیهای با قطر منفذ ۰/۲۲ یا ۰/۴۵ میکرومتر استفاده نمایید. این فیلترها باید قبل از استفاده، در اتوکلاو استریل شوند. در مورد غشاء ها و صافیهایی که در بسته بندیهای استریل به فروش می رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نمایید. قسمت های مختلف دستگاه صافی را با صافی یا بدون صافی در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ $^{\circ}$C استریل نمایید.

آماده سازی جهت مصرف:

بعد از استریلیزاسیون، اجازه دهید دمای محیط کشت به حدود ۵۰ $^{\circ}$C برسد، سپس با رعایت شرایط آسپتیک در ظروف نهایی تقسیم نمایید. هیچ وقت محیط کشت را در دمای بالاتر از ۵۰ $^{\circ}$C تقسیم نکنید. مکمل های حساس به گرما و حرارت باید بعد از این که دمای محیط کشت به حدود ۵۰ $^{\circ}$C رسید، به آن اضافه شوند. اجازه دهید دمای مکمل (ساپلمنت) استریل قبل از این که به محیط کشت اضافه شود، به دمای اتاق برسد. سپس مکمل را با رعایت

شرایط آسپتیک به محیط کشت اضافه نموده، خوب مخلوط کنید و در ظروف نهایی که از قبل استریل شده اند، تقسیم نمایید.

پتری دیش:

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولاً پتری دیش ها را را با اتیلن اکساید ویا اشعه گاما استریل می کنند. در صورت استفاده از پتری دیش هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی از نظر وجود بقایای این ماده بررسی شود زیرا اتیلن اکساید دارای خاصیت مهار کنندگی برای میکروارگانیسم ها می باشد و می توان آن را با روش کروماتوگرافی اندازه گرفت. در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای بایستی از پتری دیش هایی از جنس بروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

پارامترهای فیزیکی:

محیط کشت های تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط های کشت پلیتی نباید کمتر از ۳ میلی متر باشد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزاء تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و ذخیره کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریوستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. طول عمر اغلب محیط های کشت پلیتی در دمای ۴ درجه سانتیگراد یک هفته می باشد ولی اگر در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۴-۳ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در مجموع محیط های حاوی آنتی بیوتیک را در مدت یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان اینگونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد. پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸

ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد. محیط های کشت لوله ای در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تری دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۶-۳ ماه قابل مصرف می باشند.

موارد استثناء: تایوگلیکولات براث، اندول نیترات براث و SIM فقط به مدت یکماه قابل نگهداری می باشند. محیط های CTA Medium و OF Medium حاوی کربوهیدرات و مولرهینتون براث فقط به مدت ۶ هفته قابل نگهداری می باشند.

جدول ۱- خطاها، مشکلات و علل ممکن در استریلیزاسیون محیط های کشت

مشکلات	علل ممکن
رنگ یا تیرگی غیر طبیعی محیط کشت (ABNORMAL COLOR/DARKENING)	– آب ناخالص – ظروف شیشه‌ای کثیف – افت کیفیت محیط کشت دهیدراته – حرارت زیاد یا نادرست در طی استریلیزاسیون – pH اشتباه یا تغییر و انحراف pH – حل نشدن کامل محیط کشت – ذخیره سازی طولانی مدت در دمای ۵۰C
لخته یا منعقد شدن محیط کشت (COAGULATION)	داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن ساپلمنت(مکمل) به آن
رگه رگه شدن محیط کشت (FLECKS IN CULTURE MEDIUM)	رگه های سیاه: نیمسوز شدن آگار رگه های روشن: سرد شدن تقریبی آگار در هنگام افزودن ساپلمنت (مکمل)به آن
pH نادرست (INCORRECT pH)	آب ناخالص یا ظروف شیشه‌ای کثیف حرارت زیاد در طی استرایلیزاسیون ذوب مجدد یا ذخیره سازی طولانی مدت در دمای ۵۰C آلودگی شیمیایی کالیبراسیون نادرست pH متر حل نشدن کامل محیط کشت اندازه گیری pH در دمای بالای ۲۵C افت کیفیت محیط کشت دهیدراته ذخیره سازی نادرست یا بیش از نیمه عمر محیط کشت دهیدراته کیفیت پایین آب یا ظروف
سمّیت (TOXICITY)	حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون افت کیفیت محیط کشت دهیدراته قرارگیری در معرض نور مستقیم خورشید حجم اشتباه مکمل اضافه شده
مشکلات	علل ممکن
ایجاد رسوب یا کدورت	حرارت بیش از اندازه در طی استریلیزاسیون

(PRECIPITATION/TURBIDITY)	ذخیره سازی طولانی مدت (بیش از ۴ ساعت) در حالت مذاب بیش از ۵۰□C افت کیفیت محیط کشت دهیدراته pH اشتباه آب ناخالص یا ظروف شیشه‌ای کثیف حل نشدن کامل محیط کشت داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن کیفیت پایین آب یا ظروف
شل بودن آگار (SOFT AGAR)	حرارت بیش از اندازه (به ویژه در مقایر pH پایین) هیدرولیز اسید در محیط کشت با pH پایین توزین یا مخلوط کردن نادرست حل نشدن کامل آگار حجم نادرست آب رقیق سازی زیاد با مایه تلقیح یا مکمل‌های محیط کشت ذخیره سازی طولانی مدت در دمای ۵۰□C
رشد باکتریولوژیک ضعیف یا اثر روی خواص انتخابی/ افتراقی	توزین یا مخلوط کردن نادرست آب یا ظروف آلوده مواد مهارکننده در آب یا ظروف افت کیفیت محیط کشت دهیدراته داغ بودن محیط کشت در هنگام افزودن مکمل به آن داغ بودن محیط کشت در هنگام کشت نمونه بر روی آن ذخیره سازی طولانی مدت محیط کشت خشک شدن بیش از حد سطح محیط کشت حل نشدن کامل محیط کشت تیرگی محیط کشت و تغییر و انحراف pH حرارت بیش از اندازه و طوالنی مدت
شل بودن آگار (SOFT AGAR)	حرارت بیش از اندازه به ویژه در مقایر pH پایین هیدرولیز اسید در محیط کشت با pH پایین توزین یا مخلوط کردن نادرست حل نشدن کامل آگار حجم نادرست آب رقیق سازی زیاد با مایه تلقیح یا مکمل‌های محیط کشت ذخیره سازی طولانی مدت در دمای ۵۰□C

کنترل کیفی محیط های کشت میکروبی:

اصطلاحات مربوط به سویه های میکروبی کنترل

- سویه کنترل (Control Strain): میکروارگانیسمی که برای ارزیابی عملکرد میکروبی محیط کشت استفاده می‌شود.
- سویه مرجع (Reference Strain): میکروارگانیسمی که حداقل تا سطح جنس و گونه شناسایی شده و بر اساس ویژگی ها و ترجیحاً منشا آن، فهرست بندی و تعریف شده است.
- ذخیره های مرجع (Reference Stocks): کشت های بدست آمده از پاساژ سویه مرجعی که از مراکز بین المللی تهیه شده است.
- ذخیره های کاری (Working Stocks): کشت مجددی که از کشت های ذخیره جهت کنترل کیفیت محیط های کشت استفاده می شود.

منبع سویه های کنترل:

همه سویه های کنترل که در جدول ۲ از آنها نام برده شده است، ATCC می باشند (American type culture collection). این سوشها، حداقل سوشهایی هستند که باید برای ارزیابی هر محیط کشت استفاده شوند. ارگانیسم های مورد استفاده برای اهداف کنترل کیفی می تواند از سویه های National collection باشد. سویه های دیگری نیز ممکن است توسط سازنده محیط کشت به کار رود که شامل مجموعه ای از سویه های وحشی (Wild strain) یا بدست آمده از نمونه های بیمار می باشد که مختص هر آزمایشگاه بوده و برای انجام آزمایش های بیشتر به کار می روند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت محیط های کشت

تهیه سوسپانسیون میکروبی:

یک کشت از ارگانیسم کنترل کیفی روی پلیت بلادآگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون پلیت ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی تریپتیکیس سوی براث (TSB) استریل حل نمایید تا سوسپانسیون میکروبی حاصل شود و آن را برای

چهار یا پنج ساعت انکوبه نمایید. سپس کدورت آن را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید. (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵ nm، دارای جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱ ناتومتر می باشد)

به جای این روش می توان مستقیماً از کلنی های ایزوله روی پلیت، سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مک فارلند تهیه کرد. بدین ترتیب که ۵-۳ کلنی ایزوله روی پلیت ۲۴ ساعته را در ۵-۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن را با نیم مک فارلند تنظیم نمایید. با هر روشی که این سوسپانسیون میکروبی تهیه شود، باید کدورتی حاوی CFU/ml $۱۰^{۷}$-$۱۰^{۸}$ کلنی داشته باشد. (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند).

بررسی آزمایش های عملکردی محیط کشت (Performance testing)

۱- **آزمایش ظرفیت مغذی بودن** (Nutritional activity) **محیط های کشت پلیتی** مانند بلاد آگار

سوسپانسیون اولیه را به نسبت **۱ به ۱۰۰** در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) $۱۰^{۳}$-$۱۰^{۴}$ می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون را ده بار رقیق تر تهیه نمایید.

۲- **آزمایش ظرفیت مهار کنندگی محیط های کشت انتخابی پلیتی** مانند مکانکی آگار

سوسپانسیون اولیه را به نسبت **۱ به ۱۰** در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار µl ۱۰ یا ml۰/۰۱ سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) $۱۰^{۴}$-$۱۰^{۵}$ می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر تهیه شود.

۳- آزمایش محیط های کشت لوله ای

هر لوله باید با µl ۱۰ یا ml ۰/۰۱ از سوسپانسیون اولیه تهیه شده مطابق با نیم مک فارلند (بدون رقیق سازی) تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط مورد آزمون را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول ۲ آمده است، انکوبه نمایید. به طور نرمال زمان انکوباسیون، ۲۴-۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵±۲ ^{o}C می باشد. محیط شکلات آگار و سایر محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰- ۵٪ Co_2 انکوبه شوند و در فواصل زمانی۲۴-۱۸ ساعت وسپس ۴۸-۲۴ ساعت بررسی گردند.

برای باکتری های بی هوازی، کشتها عموماً به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی و غنی از Co_2 نیاز دارند.

در مورد کمپیلوباکتر آگار، پلیتها باید در ۴۲ ^{o}C در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

۴- کنترل محیط های کشت برای آزمایشهای بیوشیمیایی

از سوسپانسیون میکروبی رقیق نشده برای کنترل این محیطها استفاده می کنیم.

پس از تلقیح، تمام کشت ها را در شرایط لازم (از نظر Co_2، رطوبت و یا شرایط بیهوازی و درجه حرارت مناسب) قرار داده و پس از طی مدت زمان لازم (۲۴ تا ۴۸ ساعت) آنها را مورد بررسی قرار می دهیم. محیط های مناسب دارای رشد کافی از کلنی های باکتریهای مورد نظر می باشند و در مورد محیطهای انتخابی مهار میکروارگانیسمهای مورد نظر باید مشخص باشد.

کنترل محیط های ساخته شده تجاری (آماده مصرف):

۱-رطوبت: محیطهای کشت باید بدون هر گونه رطوبت اضافی بوده، همچنین هیچ نشانه ای از خشک شدن اطراف محیط کشت نباید مشاهده گردد.

۲-سترون بودن: محیطهای کشت باید عاری ازآلودگی باشند.

رنگ: محیطهای کشت آگار خوندار نباید هیچ نشانه ای از همولیز داشته باشند و محیطهای کشت دیگر نباید هیچگونه تغییر رنگ غیر طبیعی داشته باشند.

بررسی آلودگی محیط های کشت (استریل بودن محیط های کشت):

در صورتیکه تعداد پلیت یا لوله تهیه شده در هر سری ساخت یا Lot، ۱۰۰ عدد یا کمتر باشد، باید به تعداد ۵-۳٪ محیط های تهیه شده را در دمای ^{o}C ۳۷-۳۵ به مدت ۵-۲ روز انکوبه نمود. برای Lot های با تعداد بیش از ۱۰۰، باید به تعداد ۱۰ پلیت یا لوله را به طور تصادفی برداشته و در شرایط فوق انکوبه نمود. بعد از انکوباسیون هیچ گونه رشد میکروبی نباید مشاهده شود.

تفسیر نتایج:

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های پیشنهادی برای آزمون محیط کشت که در جدول ۲ مشخص شده است، رشد کافی داشته و خصوصیات مورفولوژیکی کلنی ها بارز باشد. در مورد محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسم های خاص مهار می شود، ضمن اینکه اجازه رشد کافی به سایرارگانیسم می دهد. در بعضی موارد، واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲ آمده است، باید ایجاد شود. مثلاً در مورد کشت بلادآگار ایجاد همولیز مناسب ضروری است و یا برای محیط مکانکی آگار ایجاد واکنش های رنگی برای سویه های میکروبی مشخص ضروری می باشد.

سایر معیارهای تضمین کیفیت:

محیطهای کشت آماده مصرف باید از نظرموارد زیر نیز بررسی شوند:

- شکستگی ظروف پتری
- پر شدن ناصاف پلیتها
- ترک خوردگی محیط کشت در پلیتها
- وجود همولیز (برای بلاد آگار)
- یخ زدگی
- وجود مقدار زیاد حباب یا حفره در سطح محیط کشت

جدول ۲

محیط کشت	زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی	نتیجه قابل انتظار
بایل اسکولین آگار	۲۴ ساعت	S. faecalis *استرپتوکوک فکالیس* S. pyogenes *استرپتوکوک پایوژنز*	رشد مثبت، محیط سیاهرنگ می شود رشد منفی
بلاد آگار جار شمع دار CO_2	۲۴ ساعت	*استرپتوکوک پایوژنز* Streptococcus pyogenes S. pnemoniae *استرپتوکوک پنومونیه*	رشد مثبت دارای همولیزبتا رشد مثبت دارای همولیز آلفا
شکلات آگار	۲۴ ساعت	*هموفیلوس آنفلوانزا* Haemophilus influenzae	رشد مثبت
لایزین دکربوکسیلاز (محیط بوسیله روغن استریل پوشانده میشود)	۴۸ ساعت	S. typhimurium *سالمونلا تایفی موریوم* Shigella flexneri *شیگلافلکسنری*	مثبت (بنفش رنگ می شود) منفی (بدون تغییر رنگ)
اورنیتین (دکربوکسیلاز)	۴۸ ساعت	S. typhimurium *سالمونلا تایفی موریوم* K. pneumoniae *کلبسیلا پنومونیه*	مثبت منفی
آرژینین (دی هیدرولاز)	۴۸ ساعت	S. typhimurium *سالمونلا تایفی موریوم* Proteus mirabilis *پروتئوس میرابیلیس*	مثبت منفی
ژلاتیناز	۲۴ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی* Bacillus subtilis *باسیلوس سوبتیلیس*	منفی مثبت
کلایگلرآیرون آگار	۲۴ ساعت	Citrobacter frundii *سیتروباکتر فروندی* S. typhimurium *سالمونلا تایفی موریوم* Sh. flexneri *شیگلا فلکسنری* *اسینتوباکتر کالکوستیکوس* Acinetobacter calcoaceticus	A/A, SH_2 + گاز K/A, SH_2 + گاز یا بدون گاز K/A تغییر نمی کند
مک کانکی آگار (همراه با کریستال ویوله)	۲۴ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی* Proteus mirabilis *پروتئوس میرابیلیس* S. faecalis *استرپتوکوک فکالیس*	کلنی های قرمز رنگ کلنی های بیرنگ، بدون سوارمینگ (خزش) رشد منفی
مالونات	۲۴ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی*	منفی (سبز رنگ)

			مثبت (آبی رنگ)
مانیتول سالت آگار	۲۴ ساعت	S. aureus *استافیلوکوک اورئوس* S. epidermidis *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* E. coli *اشرشیا کلی*	کلنی های زرد رنگ کلنی های قرمز رنگ رشد منفی
MRVP	۴۸ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی* K. pneumonia *کلبسیلا پنومونیه*	MR مثبت- VP منفی MR منفی- VP مثبت
مولرهینتون آگار	۲۴ ساعت	*استافیلوکوک اورئوس* S. aureus ATCC ۲۵۹۲۳ *سودوموناس آئروژینوزا* P. aeruginosa ATCC ۲۷۸۵۳ E. coli ATCC ۲۵۹۲۲ *اشرشیا کلی*	به جدول میزان هاله عدم رشد قابل قبول در بخش آنتی بیوگرام مراجعه شود
نیترات براث	۲۴ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی* *اسینتوبا کتر کالکوستیکوس* Acinetobacter calcoaceticus	مثبت منفی
آب پپتونه (اندول)	۲۴ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی* K. pneumoniae *کلبسیلا پنومونیه*	مثبت منفی
فنیل آلانین دآمیناز	۲۴ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی* P. mirabilis *پروتئوس میرابیلیس*	منفی مثبت
سالمونلا شیگلا آگار (S.S) یا دزوکسی کلات سیترات آگار	۲۴ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی* *سالمونلا تایفی موریوم* Salmonella typhimurium *یرسینیا انتروکولیتیکا* Yersinia enterocolitica Shigella flexneri *شیگلا فلکسنری*	منفی کلنی های بیرنگ کلنی های بیرنگ کلنی های بیرنگ
سلنیت برات (SF)	۲۴ ساعت	S. typhimurium *سالمونلا تایفی موریوم* E. coli *اشرشیا کلی*	بعد از کشت مجدد رشد می کند بعد از کشت مجدد رشد نمی کند
سیمون سیترات	۴۸ ساعت	E. coli *اشرشیا کلی*	رشد منفی

(در لوله های با درپیچ شل در انکوباتور گذاشته شود)		*کلبسیلا پنومونیه* K. pneumonia	رشد مثبت- رنگ آبی
TCBS آگار	۲۴ ساعت	Vibrio SPP	کلنی های زرد رنگ
تایر مارتین	۲۴ ساعت	*نایسریا مننژیتیدیس* Neisseria meningitidis (CO_2)	رشد مثبت
		نایسریا گونوره N. Gonorrhoeae	رشد مثبت
		اشرشیا کلی E. coli	رشد منفی
تایوگلیکولات براث Thioglycollate broth	۲۴ ساعت	*باکتروئیدس فراجیلیس* Bacteriodes fragilis	رشد مثبت
TSI عمق محیط باید ۳ سانتی متر باشد (با درپیچ شل اتوو گذاری شود)	۲۴ ساعت	*سیتروباکتر فروندی* Citrobacter frundii	A/A, SH_2 + گاز
		سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium	K/A, SH_2 + گاز یا بدون گاز
		شیگلا فلکسنری Sh. flexneri	K/A
		اسینتوباکتر کالکوستیکوس Acinetobacter calcoaceticus	تغییر نمی کند
محیط اوره	۲۴ ساعت	*اشرشیا کلی* E. coli	منفی
		پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis	مثبت، صورتی

روش های تهیه گسترش و رنگ آمیزی

درون پروتوپلاست باکتری ها موادی وجود دارد که ضریب شکست نوری و دانسیته آن ها نسبت به محیط اطراف متفاوت است. این تفاوت آن اندازه نیست که تنها با استفاده از میکروسکوپ های نوری معمولی و بدون رنگ آمیزی، باکتری قابل مشاهـده باشد، لذا چندین روش گوناگون رنگ آمیـزی ابداع شده تا بتـوان بر پایه هر روش تمام سلول باکتـری و یا قسمت هایی از آن را مطالعه نمود. می توان از رنگ آمیزی به عنوان نخستین قدم در تشخیص باکتری ها استفاده کرد.

مطالعه باکتری:

باکتری های رنگ آمیزی نشده به سختی در زیر میکروسکوپ دیده می شوند. در بیشتر موارد در آزمایشگاه های میکروب شناسی مشاهده دقیق باکتری ها، بررسی های مورفولوژیک و یا تعیین اندازه باکتری اهمیت زیادی دارد و در این موارد لازم است که از میکروارگانیسم گسترش تهیه کرده و با روش های انتخابی رنگ آمیزی نمود. تمامی باکتری ها در جریان رنگ آمیزی کشته می شوند. برای رنگ آمیزی باید از باکتری گسترش (Smear) تهیه و سپس بر حسب روش رنگ آمیزی، باکتری را رنگ نمود.

تهیه گسترش (smear):

۱- انتقال باکتری بر روی لام:

نخست لام را با الکل و دستمال تمیز کرده(در صورت لزوم) و یک قطره محیط مایع یا جامد (با روش عنوان شده در زیر) را بر روی لام قرار داده و به صورت لایه ای نازک پخش شود. اگر این لایه ضخیم باشد نور به خوبی از آن عبور نکرده و میدان دید میکروسکوپی تاریک به نظر می رسد. برداشت از محیط مایع و جامد به منظور تهیه گسترش به صورت زیر است.

الف- برداشت از محیط مایع:

اگر هدف تهیه گستره از باکتری رشد کرده در محیط مایع باشد نخست لوپ را روی شعله استریل کرده و برای مدتی خارج از شعله نگه داشته تا خنک شود. به کمک لوپ از داخل محیط کشت مایع مقداری باکتری خارج و بر روی لام

قرار داده و با حرکت دورانی از مرکز به شکل بیضی و با رعایت فاصله مناسب از لبه های لام پخش نمایید. لوپ را فوراً بعد از انتقال باکتری بر روی لام، با شعله استریل کنید.

ب- برداشت از محیط جامد:

یک قطره سرم فیزیولوژی روی لام ریخته و با استفاده از لوپی که روی شعله استریل شده یک کلنی باکتری را برداشته و در قطره روی لام سوسپانسیون یکنواختی تهیه و پخش شود. هر چه گستره نازک تر و یکنواخت تر باشد بررسی میکروسکوپی آن راحت تر صورت می گیرد.

۲- خشک کردن (Drying):

بعد از قرار دادن باکتری بر روی لام، سوسپانسیون مدت ۲-۱ دقیقه در مجاورت هوا خشک می شود. بهتر است لام را به صورت مایل قرار داده و از دست زدن به آن پرهیز کرد. برای خشک کردن لام نباید از شعله استفاده نمود. گسترش مورد نظر باید کاملاً خشک گردد.

۳- ثابت کردن (Fixation) :

پس از خشک شدن برای جلوگیری از کنده شدن نمونه در حین رنگ آمیزی الزامی است نمونه بر روی لام ثابت شود. این کار فیکس کردن نمونه نام دارد. روش های فیکس کردن متنوع بوده ولی معمولا از حرارت یا الکل استفاده می شود. در روش حرارت، پشت لام سه مرتبه از روی شعله عبور داده می شود. وظیفه شعله چسبانیدن گسترش بر روی لام است. لازم است پس از این که لام سه مرتبه از روی شعله عبور داده شد با پشت دست حرارت لام امتحان شود به گونه ای که گرما احساس شود اما این حرارت نباید خیلی کم و یا سوزاننده باشد زیرا در صورت کم حرارت دادن نمونه فیکس نشده و در صورت زیاد حرارت دادن مورفولوژی باکتری تغییر می کند.

۴- رنگ آمیزی (Staining):

برای این که یک ماده رنگی بتواند باکتری ها و بافت ها را رنگ آمیزی کند باید افزون بر ریشه رنگی که آن را کروموژن می نامند ریشه دیگری نیز داشته باشد که پس ازحل شدن در آب یونیزه شده و ماده رنگی را دارای بار الکتریکی مثبت یا منفی نماید تا بتواند با مواد اسیدی یا بازی سلول ها ترکیب شود که این ریشه را اگزوکروم می نامند.

رنگ هایی که پس از یونیزه شدن دارای بار الکتریکی منفی باشند، به نام رنگ های اسیدی معروفند و با مواد بازی سلول ها که بار الکتریکی مثبت دارند ترکیب می شوند مانند ائوزین.

رنگ هایی که پس از یونیزه شدن دارای بار الکتریکی مثبت باشند به نام رنگ های بازی معروفند ومی توانند با مواد اسیدی سلول ها که بار منفی دارند ترکیب شوند مانند بلودومتیلن.

چون درسیتوپلاسم مقدار زیادی اسید نوکلئیک وجود دارد که دارای بار الکتریکی منفی است، باکتری ها میل ترکیبی زیادی به رنگ های بازی دارند. از رنگ های اسیدی برای رنگ آمیزی باکتری ها استفاده نمی شود ولی برای رنگ کردن زمینه گسترش مناسب اند.

از بعضی مواد رنگی می توان برای از بین بردن، جلوگیری از رشد و تهیه محیط های کشت ویژه باکتری ها استفاده نمود.

روش های رنگ آمیزی براساس تعداد رنگ و مراحل رنگ آمیزی به دو دسته رنگ آمیزی ساده و مرکب (Complex) تقسیم می شوند:

الف- رنگ آمیزی ساده :

دراین روش تنها از یک ماده رنگی استفاده و همه باکتری ها به یک رنگ دیده می شوند. می توان به وجود، تعداد تقریبی سلول باکتری در نمونه و به شکل باکتری پی برد.

ب- رنگ آمیزی مرکب :

در این روش از دو یا چند ماده رنگی استفاده می شود. یکی به عنوان رنگ اصلی و دیگری به عنوان رنگ مخالف (Counter stain) به کار می رود. روش های بسیار گوناگونی برای رنگ آمیزی باکتری ها به روش مرکب وجود دارد که مهم ترین و کاربردی ترین آن ها رنگ آمیزی گرم (Gram) است.

مکانیسم رنگ آمیزی گرم:

این روش تفاوت شیمیایی بین دیواره در دو گروه میکروارگانیسم ها را مشخص می کند. گروهی از باکتری ها که گرم مثبت نامیده شده و پس از رنگ آمیزی بنفش رنگ می شوند و گروهی که گرم منفی هستند و در نتیجه رنگ آمیزی، قرمز رنگ می شوند.

بیشتر باکتری ها پس از رنگ آمیزی با رنگ های پارا روزانیلین مانند کریستال ویولت و تثبیت رنگ ها، هنگامی که در معرض ترکیبات رنگ بر مانند الکل یا استون قرار گیرند رنگ خود را از دست نمی دهند در حالی که گروهی از باکتری ها در این مرحله رنگبری می گردند. باکتری هایی که پس از مرحله رنگبری، رنگ خود را حفظ نموده، گرم مثبت و باکتری هایی که بی رنگ می شوند گرم منفی نام می گیرند. برای بهتر دیده شدن باکتری های بدون رنگ می توان از رنگ دوم استفاده کرد که با رنگ اول متفاوت باشد در این حالت باکتری های گرم منفی با رنگ دوم (سافرانین) قرمز رنگ می شوند.

مکانیسم رنگ آمیزی گرم تا کنون به طور کامل شناخته نشده و به نظر می رسد که تنها ترکیبات شیمیایی دیواره سلولی بیان کننده چگونگی رنگ آمیزی گرم باشد. به علت این که سلول های مخمر که دارای دیواره سلولی ضخیمی هستند (هرچند که از لحاظ ساختمان شیمیایی با باکتری های گرم مثبت متفاوتند) دراین رنگ آمیزی گرم مثبت می گردند بنابر این به نظر می رسد که پدیده های فیزیکی مانند ضخامت دیواره سلولی، منافذ و قابلیت نفوذ پذیری پوشش سالم سلول نیز در رنگ آمیزی گرم اهمیت داشته باشند. هم چنین چند فرضیه دیگر در این زمینه وجود دارد که توضیح داده می شود.

۱- ویوله و ید در داخل باکتری ها با هم ترکیب شده و مولکول درشتی را به وجود می آورند که از جدار باکتری های گرم مثبت نمی تواند خارج شود ولی از جدار باکتری های گرم منفی که قابلیت نفوذ بیشتری دارد به آسانی خارج می شوند.

۲- قسمت بیشتر دیواره باکتری های گرم مثبت از پپتیدوگلیکان و یا موکوپپتید تشکیل شده که از نفوذ الکل-استون به داخل باکتری جلوگیری کرده و مولکول کریستال ویوله نمی تواند درآن حل شده و از باکتری خارج شود. درصورتی که قسمت بیشتر دیواره سلولی باکتری های گرم منفی از لیپوپروتئین تشکیل شده که اگر تحت تاثیر الکل-استون

(حلال چربی) قرار گیرد، قابلیت نفوذ بیشتری پیدا می کند و این مواد داخل باکتری شده، مولکول کریستال ویوله و ید را در خود حل کرده و از باکتری خارج می نمایند.

این روش کاربردی ترین روش رنگ آمیزی در باکتری شناسی است و در تشخیص مقدماتی باکتری ها اهمیت زیادی دارد.

ترکیبات رنگ آمیزی گرم:

کریستال ویوله: رنگ اولیه یا رنگ اصلی

محلول ید(لوگل): رنگ دندانه (Mordant)

الکل استون: رنگ بر(Decolorizer)

سافرانین: رنگ دوم (counter stain)

روش کار:

۱- ریختن رنگ کریستال ویوله روی گسترش فیکس شده ← ۱ دقیقه

۲- شستشو با آب

۳- ریختن لوگل بر روی گستره ← ۱ دقیقه

۴- شستشو با آب

۵- رنگ بری با الکل-استن به مدت x ثانیه. این مرحله اهمیت فراوانی دارد چرا که کمتر یا بیشتر شدن زمان کاملاً در نتیجه رنگ آمیزی اختلال ایجاد می کند. می توان به جای انتخاب زمان رنگ بری، لام را کمی شیب دار گرفته و از قسمت بالای گسترش الکل-استن را قطره قطره روی گسترش ریخت تا حدی که از گسترش، دیگر رنگ بنفش خارج نشود.

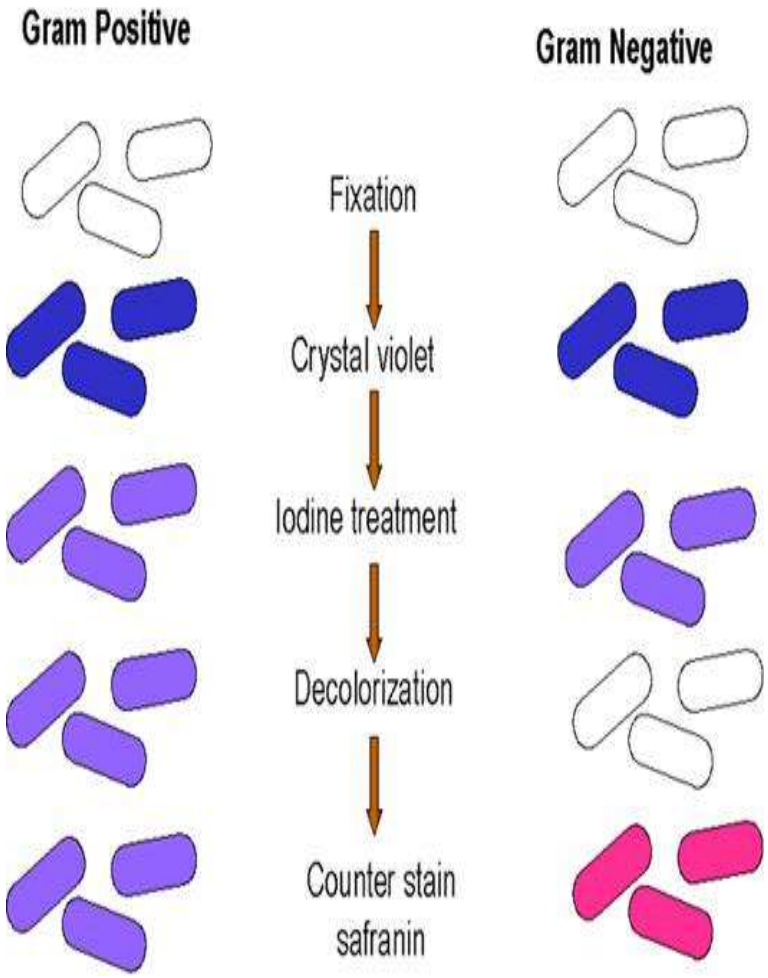
۶- شستشو با آب

۷- ریختن سافرانین ← ۴۰-۳۰ ثانیه

۸- شستشو با آب

(لازم به ذکر است که از هر مرحله به مرحله بعد نیازی به خشک کردن لام نیست.)

مرحله پایانی، خشک کردن لام در مجاورت هوای آزمایشگاه و یا با روش Blotting (استفاده از کاغذ خشک کن)



دستورالعمل رنگ آمیزی گرم

اصول:

در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی، رنگ آمیزی گرم آزمایشی مهم برای تشخیص احتمالی سریع عوامل عفونی است و کیفیت نمونه های بالینی را ارزیابی می کند . این آزمایش برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل، اندازه، مورفولوژی سلول و واکنش گرم آنها به کار می رود.

تفسیر گسترش هایی که رنگ آمیزی گرم شده اند، با در نظر گرفتن مشخصه های رنگ آمیزی ، اندازه، شکل و آرایش سلول صورت می گیرد. این مشخصه ها ممکن است بوسیله بسیاری از فاکتورها مانند مدت زمان ماندگی پلیت ها،

محیط کشت، اتمسفر انکوباسیون ، روش رنگ آمیزی و وجود مواد مهارکننده تحت تأثیر قرار بگیرند. برای تفسیر اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بالینی مانند خلط، به وجود عوامل اضافی مانند انواع سلول های میزبان و فاگوسیتوز نیز می بایست دقت نمود .

نمونه:

اسمیر برای رنگ آمیزی گرم ممکن است از نمونه های بالینی، محیط براث یا کلنی های رشد کرده روی محیط کشت جامد تهیه شود. نمونه های بالینی تازه وکشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت) از محیط های غیرمهارکننده ، صحیح ترین نتایج را می دهند؛ برای برخی بررسی های مورفولوژیکی، اسمیر تهیه شده از کشت براث مورد نیاز می باشد.

مواد:

۱- **معرف ها**

معرف ها ممکن است به صورت تجاری خریداری شوند یا در آزمایشگاه تهیه گردند.

الف) Hucker's modification

- کریستال ویوله
- ید

احتیاط: ید خاصیت خورندگی دارد. از استنشاق، خوردن یا تماس آن با پوست خودداری کنید.

- رنگ برها

۱) کندترین رنگ بر: اتانول ۹۵ ٪

۲) رنگ بر متوسط: استون ـ الکل؛ مخلوطی از ۱۰۰ ml اتانول ۹۵٪ و ۱۰۰ ml استون (reagent grade) را در بطری شیشه ای قهوه ای رنگ ترکیب کنید، با یک سال تاریخ انقضاء، برچسب بزنید و در حرارت اتاق نگهداری کنید.

۳) سریع ترین رنگ بر: استون (reagent grade)

احتیاط: اتانول و استون قابل اشتعال هستند.

- **Counterstains** (رنگ متقابل)

۱) سافرانین

۲) به طور جایگزین: فوشین بازی (۰/۲ ٪ یا ۰/۱ ٪)

ب) Kopeloff's modification for anaerobes

ج) Carbol-fuchsin–basic fuchsin counterstain

۲- **وسایل و مواد مورد نیاز**

- لام شیشه ای (۲۵×۷۵mm)
- NaCl ۰/۸۵ ٪ استریل
- پی پت پاستور و اپلیکاتور چوبی استریل
- لوپ میکروب شناسی، آنس تلقیح سازی
- Safety box برای دور ریختن زباله بیولوژیک شامل وسایل نوک تیز
- روغن ایمرسیون

۳- **تجهیزات**

موارد اختیاری با توجه به نوع نمونه : سانتریفوژ، ورتکس، لوله درپیچ دار استریل، قیچی، اسکالپل و پنس استریل ، خردکن بافت و متانول خالص

نکته: متانول را در بطری های درپیچ دار قهوه ای ذخیره کنید. ذخیره کاری را می توان در ظروف پلاستیکی برای حداکثر دو هفته ذخیره نمود .

کنترل کیفی:

۱) **روزانه معرف ها را از نظر ظاهری بررسی کنید.**

۱- اگر کریستال ویوله رسوب کرده یا ته نشین شده، قبل از استفاده آن را صاف کنید، حتی زمانی که معرف ها به صورت تجاری خریداری می شوند.

نکته: بعضی رنگ ها، خصوصاً فوشین بازی و سافرانین می توانند آلوده شوند. در صورت شک به آلودگی ، انجام رنگ آمیزی با استفاده از معرف تازه توصیه میگردد .

۲- تبخیر شدن مواد ممکن است کارایی و تأثیر معرف ها را دگرگون کند. اگر محلول های کاری با مصرف روزانه تمام نمی شوند، باید به طور منظم تعویض شوند.

۲) **به طور روزانه و زمانی که یک سری ساخت جدید استفاده می شود، گسترشی از *اشریشیا کلی* (ATCC ۲۵۹۲۲) و *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* (ATCC ۱۲۲۲۸) و یا *استافیلوکوک اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) تهیه و فیکس کرده و مطابق روش فوق رنگ آمیزی کنید.**

نتایج مورد انتظار: - باسیل های گرم منفی، صورتی - کوکسی های گرم مثبت، بنفش پررنگ

توجه:بعنوان روش کنترل کیفی جایگزین پیشنهاد میشود با یک اپلیکاتور چوبی از بین دندان ها نمونه گیری شود؛ هم ارگانیسم های گرم مثبت و هم گرم منفی وجود خواهد داشت.

۳) **برخی از علل رایجی که موجب تهیه اسلاید رنگ آمیزی گرم نامناسب می گردند:**

- استفاده از لام های شیشه ای که قبلا تمیز یا چربی زدایی نشده اند.

توجه: با ذخیره لام ها در ظرف حاوی اتانول ۹۵٪ از تمیز بودن آنها مطمئن خواهیم بود. قبل از استفاده، الکل اضافی را از روی لام خالی کنید یا آن را روی شعله بگیرید.

- گسترش ها خیلی ضخیم تهیه شده است.
- حرارت دادن زیاد گسترش، زمانی که برای فیکس کردن از حرارت ا ستفاده می شود.
- آب کشی زیاد در طی فرایند رنگ آمیزی

۴) **برای اطمینان از صحت تفسیر، سیستمی برای بررسی گزارش های رنگ آمیزی گرم برقرار کنید.**

- بررسی روزانه تعدادی از رنگ های گرم توسط سوپروایزر
- مقایسه نتایج کشت نهایی با گزارش های رنگ آمیزی گرم
- گردآوری مجموعه ای از لام های مرجع برای آموزش

روش انجام آزمایش:

A. **تهیه اسمیر**

اسمیر مناسب باید لایه ای از ارگانیسم ها با تراکم مناسب برای مشاهده آسان ایجاد نماید. پراکندگی ارگانیسم ها می بایست به نحوی باشد که آرایش آنها مشخص شود. برای تهیه اسمیر از لام های شیشه ای نو و تمیز استفاده نمایید.

نکته: زمانی که از یک پی پت یا سواب برای تهیه اسمیر و تلقیح محیط کشت استفاده می کنید، همیشه قبل از تهیه اسمیر، ابتدا محیط کشت را تلقیح کنید.

۱- نمونه های بالینی:

نکته : استفاده از دستکش لاتکس در زمان کار روی نمونه های بالینی ضروری است .

a. نمونه های دریافت شده روی سواب: ترجیحاً باید یک سواب جداگانه برای تهیه اسمیر آماده شود .

۱) جهت جلوگیری از تخریب عناصر سلولی و از بین رفتن آرایش باکتریایی، به آرامی سواب را در سرتاسر لام بچرخانید.

۲) در مواردی که فقط یک سواب دریافت می شود، سواب را در مقدار کمی سالین قرار داده و آن را ورتکس کنید. سواب را به دیواره داخلی لوله بفشارید و آن را برای تهیه گسترش به کار ببرید. از باقیمانده سوسپانسیون برای تلقیح محیط کشت استفاده کنید.

b. نمونه هایی که روی سواب دریافت نمی شوند شامل: آسپیره ها، ترشحات، چرک، مدفوع

۱) اگر نمونه در یک سرنگ دریافت شده باشد، ابتدا تمامی آن را در یک لوله استریل بریزید. در صورت کافی بودن حجم نمونه آن را ورتکس کنید.

نکته: سرنگ های همراه سوزن را ، نپذیرید. به کارکنان مربوطه جداسازی ایمن سوزن ها را آموزش دهید .

۲) با استفاده از یک اپلیکاتور، پی پت یا لوپ سیمی استریل قسمت های چرکی یا خونی نمونه را انتخاب کنید. نمونه های خیلی غلیظ یا نمونه های چرکی را می توان در یک قطره سالین روی لام رقیق نمود تا تهیه اسمیر آسان تر شود.

۳) نمونه را روی منطقه بزرگی از لام پهن کنید تا یک لایه نازک ایجاد شود.

c. CSF و سایر مایعات بدن که نیاز به سانتریفوژ دارند

بعضی از آزمایشگاهها ممکن است برای تغلیظ مایعات بدن و تهیه اسمیر از Cytopsin Slide Centrifuge استفاده کنند. این روش به افزایش حساسیت رنگ گرم ،کاهش زمان سانتریفوژ و دسترسی سریعتر به نتیجه کمک می نماید.

۱) بعد از انجام سانتریفوژ، با استفاده از پی پت استریل، محلول رویی را به یک لوله استریل منتقل کنید، حدود ml ۵/۰ را به عنوان رسوب باقی بگذارید.

۲) رسوب را ورتکس کرده یا با چند بار داخل و خارج کردن از یک پی پت پاستور استریل آنرا کاملا مخلوط نمایید.

۳) با استفاده از پی پت پاستور یک قطره کوچک از رسوب را روی یک لام تمیز قرار دهید.

۴) قطره را پخش نکنید. اجازه دهید تا در مجاورت هوا خشک شود.

d. نمونه های ادرار

۱) سانتریفوژ نکنید. نمونه را به خوبی مخلوط کنید.

۲) با استفاده از یک پی پت پاستور استریل ۱ قطره را روی لام قرار دهید. قطره را پخش نکنید.

۳) اجازه دهید قطره در مجاورت هوا خشک شود.

e. مواد خشک یا مقادیر خیلی کم نمونه های بالینی:

۱) نمونه را در ۰/۵ میلی لیتر سالین استریل حل کنید. در صورت نیاز ورتکس نمایید.

۲) با استفاده از پی پت پاستور استریل ۱ قطره را روی لام قرار دهید.

۳) با استفاده از نوک پی پت، قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

f. بیوپسی ها و برش های بافت

تهیه نمونه حاصل از تماس مستقیم اسلاید با سطح نمونه (touch prep) و/یا نمونه خرد شده (ground specimen)

۱)بافت را با استفاده از قیچی یا اسکالپل استریل خرد کنید.

۲) نمونه ای حاصل از تماس مستقیم اسلاید با سطح نمونه (prep touch) تهیه کنید. با استفاده از پنس استریل قطعه ها را نگه دارید و کناره های یک یا تعداد بیشتری از قطعات خرد شده را با اسلاید شیشه ای استریل تماس دهید، برای بررسی آسانتر تماس ها را با هم دسته بندی کنید.

۳) برای نمونه های تماسی یکنواخت، یک قطره را روی اسلاید قرار دهید و به اندازه یک دایره ۲/۵ سانتی متری پخش کنید.

۲- کشت های براث:

برای جلوگیری از مخلوط شدن نمونه های مختلف روی یک لام ، توصیه می شود روی هر اسلاید، یک گسترش تهیه شود.

a. با استفاده از پی پت پاستور استریل (یا یک سوزن منفذدار، برای ظروفی مثل بطری های کشت خون، جهت جلوگیری از آلودگی با سوزن و سرنگ) یک قطره روی لام قرار دهید.

b. قطره را پخش کنید تا لایه نازکی ایجاد شود.

۳- کلنی از روی محیط های کشت جامد:

a. یک قطره سالین یا آب مقطر استریل روی لام قرار دهید.

b. مقدار کمی از کلنی را با یک اپلیکاتور، آنس یا لوپ استریل بردارید.

c . به آرامی مخلوط کنید تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردد.

B. فیکس کردن اسمیر (گسترش):

اسمیرها ممکن است با حرارت یا متانول فیکس شوند.

۱- حرارت:

a. اسمیر را در مجاورت هوا روی یک سطح صاف یا داخل اتو قرار دهید تا خشک شود.

b. اگر اسمیرها در مجاورت هوا خشک شدند، آنها را ۲ یا ۳ بار از روی شعله بگذرانید. برای جلوگیری از سوختگی یا تغییر شکل سلول ها، از حرارت زیاد استفاده نکنید .

c. بگذارید لام قبل از رنگ آمیزی خنک شود.

۲- از آنجا که حفظ مشخصات سلولهای میزبان جهت تفسیر گستره های بالینی ضروری است بهترین روش برای رنگ آمیزی گستره های مستقیم، فیکس کردن با استفاده از متانول است. این امر با ممانعت از لیز گلبول های قرمز و تخریب سلول های میزبان موجب واضح تر شدن زمینه اسلاید می گردد که تفسیر نمونه راآسانتر میکند.این روش برای همه نمونه های بالینی، مخصوصاً ادرار موکدا توصیه می شود که در عین حال مانع از شسته شدن نمونه های ادرار می گردد.

a. اسمیر را در مجاورت هوا روی یک سطح صاف خشک نمایید.

b. برای ۱ دقیقه چند قطره متانول روی لام بریزید. متانول را بدون آبکشی از روی لام خالی کنید و اجازه دهید تا اسلاید در مجاورت هوا خشک شود.

c. قبل از رنگ آمیزی، از حرارت استفاده نکنید.

C. روش انجام رنگ آمیزی:

۱- Hucker's modification

a. اسمیر فیکس شده را با محلول کریستال ویوله بپوشانید. ۳۰ ثانیه منتظر بمانید.

b. آهسته کریستال ویوله را خالی کنید، اسلاید را به آرامی با آب جاری بشوئید.

احتیاط: شستشوی بیش از حد در این مرحله می تواند باعث شسته شدن کریستال ویوله از سلول های گرم مثبت شود. برای اطمینان از جریان آرام آب در سمت اسمیردار لام، اسلاید را به صورت زاویه دار نگه دارید.

c. آب اضافی را با محلول ید شستشو دهید و سپس اسلاید را با محلول ید تازه بپوشانید. ۳۰ ثانیه منتظر بمانید.

d. اسلاید را به آرامی با آب جاری بشوئید.

e. با جاری کردن معرف روی گستره در حالی که اسلاید زاویه دار نگه داشته شده است، رنگ بری کنید. وقتی مایع جاری ، بی رنگ می شود این کار را به اتمام برسانید. زمان رنگ بری را بر اساس ضخامت اسمیر و نوع رنگ بر مورد استفاده تنظیم کنید.

f. رنگ بر اضافی را با جریان آرام آب خارج کنید.

نکته: اسمیری که بطور مناسب رنگ بری شده است، با ته رنگ سبز زیتونی و بدون آثاری از رنگ کریستال ویوله دیده خواهد شد.

g. اسلاید را با سافرانین بپوشانید و اجازه دهید رنگ متقابل(counter stain) برای ۳۰ ثانیه باقی بماند.

h. رنگ متقابل اضافی را با جریان آرام آب خارج کنید.

i. اسلاید را در وضعیت ایستاده در مجاورت هوا خشک کنید. پشت لام را با استفاده از دستمال کاغذی آغشته به استون یا الکل پاک کنید.

j. اسمیر را از نظر میکروسکوپی بررسی کنید.

۲- carbol-fuchsin counterstain/Basic

carbol-fuchsin /Basic برای شناسایی ارگانیسم های گرم منفی که رنگ کمی گرفته اند به کار می رود.

۳- Kopeloff's modification

برای مشاهده و افتراق بهتر بی هوازیها توصیه می شود از روش رنگ آمیزیKopeloff's modification استفاده شود .

گزارش نتایج:

A. نتایج و تفسیر

۱- وضعیت کلی اسمیر را با بزرگنمایی کم (۱۰×) ارزیابی کنید.

a. دقت نمایید که اسمیر بطور مناسبی رنگ بری شده باشد. بسته به نوع نمونه، زمینه عموما باید شفاف یا صورتی باشد. اگر گلبول های سفید وجود دارند، بایدبه صورت گرم منفی ظاهر شوند. رسوب های نازک سوزنی شکل کریستال ویوله را با باکتری های میله ای شکل گرم مثبت اشتباه نگیرید.

b. دقت نمایید ضخامت اسمیر مناسب باشد. برای تفسیر مناسب، گستره نمیبایستی بیش از یک سلول ضخامت داشته و روی هم افتادگی سلول ها نباید مشاهده شود.

۲- اسمیرهای تهیه شده از نمونه های بالینی را جهت بررسی موارد زیر با بزرگنمایی کم بررسی کنید:

a. مقادیر مربوط به نوتروفیل ها، مونوسیت ها و گلبول های قرمز

b. مقادیر مربوط به سلول های اپی تلیال و باکتری های فلور نرمال که ممکن است نشانگر جمع آوری نامناسب نمونه باشد.

c. وضعیت و آرایش میکروارگانیسم ها

۳- مناطق متعددی از اسمیر را با روغن ایمرسیون از نظر وجود میکروارگانیسم ها بررسی و به شیوه زیر گزارش کنید.

a. در صورت عدم مشاهده هر گونه میکروارگانیزم :"هیچ میکروارگانیسمی مشاهده نشد".

b. در صورت مشاهده میکروارگانیزمها ، تراکم کلی و مرفولوژی را شرح دهید.

۴- شکل سلولی غالب میکروارگانیسم ها را ذکر نمایید

a. شکل کلی: کوکوس، کوکوئید، کوکوباسیل، باسیل، رشته ای شکل، شبه مخمر

b. ظاهر انتهاها: کروی، شمعی شکل، مسطح، گرزی شکل، مقعر. برآمدگی کناره ها می تواند وجود اسپورها را پیشنهاد کند، اما می تواند به علت واکوئل ها، پلئومرفیسم، یا رنگ آمیزی نامنظم باشد.

c. ظاهر کناره ها: موازی، تخم مرغی شکل (برآمده)، مقعر، نامنظم

d. ماهیت محور تقارن: مستقیم، منحنی، فنری

e. پلئومرفیسم (ناپایداری در شکل): عبارت توصیفی "دیفتروئید" یا "کورینه فرم" برای توصیف باسیل های گرم مثبت به کار می رود که چند شکلی، گرزی شکل یا نامنظم و بی قاعده هستند یا آرایش نرده ای یا زاویه دار دارند (اشکال LوV).

f. گسترش شاخه ای یا سلولی

B. ثبت مشاهدات

هر آزمایشگاه باید سیاست گزارشدهی ویژه ای را تدوین کند. یافته های مهم بالینی باید جهت اطلاع به پزشک معالج اعلام شود.

- اسمیر نمونه های بالینی

برای کشت های ادرار ۲۰ فیلد یا بیشتر را بررسی کنید. اگر بطور میانگین،ن یک ارگانیسم یا بیشتر در فیلد روغن ایمرسیون دیده می شود، مثبت گزارش کنید. این با کلنی کانت $\geq 10^5$ CFU/ml همبستگی دارد.

a. مقادیر مربوط به سلول ها و میکروارگانیسم های مشاهده شده را گزارش دهید. معمولا سیستم های کمی مورد استفاده شامل موارد زیر است.

۱) عددی

a) +۱ (۱ > در فیلد روغن ایمرسیون ×۱۰۰(

b) +۲ (۱ در فیلد روغن ایمرسیون)

c) +۳ (۲ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

d) +۴ (غالب یا ۱۰< در فیلد روغن ایمرسیون)

۲) توصیفی

a) کمیاب (۱< در فیلد روغن ایمرسیون)

b) کم (۱ تا ۵ در فیلد روغن ایمرسیون)

c) متوسط (۵ تا ۱۰ در فیلد روغن ایمرسیون)

d) زیاد (۱۰< در فیلد روغن ایمرسیون)

b. مرفولوژی باکتری های مشاهده شده را ثبت کنید.

C. مرور رنگ آمیزی گرم

۱- بعد از تفسیر اسمیرها، اسلایدها را به مدت کافی برای مرور تأییدی نگه دارید .

a. روغن اضافی را خالی کنید یا به آرامی پاک کنید.

b. برای اسلایدهای کتابخانه و مجموعه های آموزشی که برای مدت زمان طولانی تری ذخیره خواهد شد، روغن ایمرسیون را می توان با محلول گزیلن پاک کرد و با یک درزگیر نظیر محلول permount پوشاند تا از محوشدگی آنها جلوگیری شود.

c. اسلایدها ممکن است کیسه های خطر زیستی را سوراخ کنند، آنها را به عنوان مواد زائد بیولوژیک " تیز و برنده" در نظر گرفته

و جهت دفع از ظروف خطر زیستی (biohazard) مطابق با دستورالعمل دفع پسماند آزمایشگاه مرجع سلامت استفاده کنید.

۲- اگر تکرار رنگ آمیزی گرم یا یک رنگ آمیزی ویژه برای تأیید یافته ها لازم است، وقتی اسمیرهای رنگ نشده اضافی در دسترس نیستند، یک اسمیر رنگ گرم را می توان رنگ بری نمود.

a. روغن ایمرسیون را با محلول گزیلن از روی اسلاید بردارید.

b. اسلاید را با الکل- استون بپوشانید تا اسمیر بی رنگ شود.

c. دوباره رنگ کنید.

توجهات :

A. نتایج رنگ آمیزی گرم میبایستی در تطابق با سایر یافته های بالینی و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

B. برای کسب نتایج صحیح، پیروی دقیق از روش انجام آزمایش و معیارهای تفسیر الزامی می باشد. صحت، ارتباط زیادی با آموزش و مهارت شخص مشاهده کننده اسلاید دارد.

C. مشاهده میکروارگانیزم های گرم مثبت و نمونه های کشت منفی ممکن است در نتیجه آلودگی معرف ها و سایر لوازم، حضور عوامل ضدمیکروبی، یا کاهش رشد ارگانیسم ها تحت شرایط کشت معمول (محیط کشت ، اتمسفر و غیره) باشد.

D. نتایج گرم نادرست ، ممکن است مربوط به کیفیت نامناسب جمع آوری نمونه باشد.

E. ممکن است گاهی واکنش رنگ آمیزی گرم با کلنی های خیلی تازه در مقایسه با کلنی های کهنه تر متفاوت باشد. وقتی که اسمیرها از ساب کالچر ۲۴ - ۱۸ ساعته تهیه می شوند (زمانی که سلول های باکتریایی در فاز لگاریتمی رشد هستند)، مرفولوژی اغلب باکتری ها در رنگ آمیزی گرم، در بهترین شرایط می باشد.

آزمایش های سنجش حساسیت باکتری بیماری زا نسبت به داروهای ضد میکروبی (آنتی بیوگرام)

نقش اولیه آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی فراهم آوردن اطلاعات برای پزشکان است تا به وسیله این اطلاعات پزشک بتواند بیماری عفونی را شناسایی و درمان کند. این اطلاعات دارای دو قسمت بسیار مهم است که شامل ۱- آیا پای عامل عفونی در میان است و ۲- کدام آنتی بیوتیک اثرات درمانی مناسبی را فراهم می آورد. ایفای صحیح این نقش مزایای فراوانی را به همراه می آورد. به بیان دیگر انتخاب آنتی بیوتیکی که برای درمان کاملا مناسب باشد باعث می شود که موارد زیر کاهش یابد

۱- میزان مرگ و میر

۲- تعداد آزمایشات مورد نیاز

۳- تعداد عکسبرداری های مورد نیاز

۴- تعداد روز های لوله گذاری برای بیماران

۵- تعداد روز های بستری شدن در ICU

۶- طول زمان دریافت درمان آنتی بیوتیکی

۷- هزینه بیمارستان

تعداد کمی از باکتری ها مانند استرپتوکوکوس پیوژنز (گروه A استرپتوکوکوس های همولیتیک) هنوز به پنی سیلین حساس اند. اما این یک استثناست نه یک قانون و بیشتر باکتری های بیماری زا می توانند فنوتیپ مقاومت نسبت به ترکیبات ضد میکروبی را به دست آورده و بروز دهند. مکانیسم های متفاوتی در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک ها دخالت دارد. ژن های کد کننده مکانیسم مقاومت، ممکن است روی کرموزوم یا عناصر خارج کرموزومی (مانند پلاسمید) قرار داشته باشند. همچنین مکانیسم مقاومت ممکن است بیان دائمی داشته باشد (مانند بتالاکتاماز های باکتری های گرم منفی) یا اینکه به صورت القایی بیان شود (مانند بتالاکتاماز استافیلوکوکوس). در نهایت مکانیسم های مقاومت ممکن است به صورت مونوژنوس (تنها یک فاکتور در ایجاد مقاومت دخالت دارد) یا هتروژنوس باشند. یافته های جدید نشان می دهند که بعضی آنتی بیوتیک ها باعث افزایش موقت میزان موتاسیون در باکتری ها می گردند. بدین ترتیب آنتی بیوتیک ها نه تنها به عنوان انتخاب کننده دسته های مقاوم باکتری فعالیت می کنند بلکه می توانند القا کننده ایجاد مقاومت نیز باشند.

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

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

۲- سن بیمار

۳- نابهنجاری های متابولیک و ژنتیکی بیمار

۴- بارداری بیمار

۵- عملکرد کبد و کلیه

۶- محل عفونت و انتشار آنتی بیوتیک در بافت و سلول های میزبان

۷- پروتئین های سرمی متصل شونده به دارو

۸- وضعیت سیستم ایمنی بیمار

۹- عفونت زایی و بیماری زایی باکتری

۱۰- شدت بیماری

بنابراین میکروبیولوژیست می تواند با بررسی آزمایشگاهی وضعیت مقاومت و یا حساسیت باکتری جدا شده از نمونه عفونی کمک بزرگی به پزشک نماید. روش های مختلفی که برای سنجش مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها به کار می روند به نام «سنجش حساسیت ضد میکروبی یا Antimicrobial susceptibility testing» نامیده می شوند. به دلیل اینکه اولین شرکتی که تولید کننده مجموعه ای برای ارزیابی حساسیت باکتری ها به مواد ضد میکروبی بود نام تجاری «آنتی بیوگرام» را بر آن نهاد، این نام معادل این روش ها در نظر گرفته می شود.

استاندارد کردن آزمایش های حساسیت ضد میکروبی

به منظور جلوگیری از بروز خطا در آزمایشگاه و یا بین آزمایشگاه ها، روش های آزمایش باید کاملاً استاندارد باشند. رعایت استاندارد در موارد زیر برای نیل به این هدف ضروری است:

- مقدار باکتری تلقیح شده

- نوع محیط کشت (در بیشتر موارد محیط کشت مولر-هینتون آگار استفاده می شود.)

- شرایط محیط کشت ازنظر PH، غلظت کاتیون ها، افزودنی هایی مانند خون و سرم

- اتمسفر انکوباسیون

- دمای انکوباسیون

- زمان انکوباسیون

- غلظت ماده ضد میکروبی

لازم به ذکر است در بعضی موارد حتی با رعایت کامل موارد استاندارد نیز نمی توان نتیجه به دست آمده از آنتی بیوگرام را به طور مطلق درمورد بیمار به کار برد.

به منظور سنجش حساسیت یک ماده ضد میکروبی روش های مختلفی وجود دارد که سه روش آن در آزمایشگاه های بالینی بیشتر استفاده می شود که شامل **انتشار از دیسک، رقت سازی سریال و روش انتشار گرادیانت**

می باشـد. به منظور آشـنایی بیشـتر تنها روش انتشـار از دیسـک (Disk Diffusion) به طور کامل توضیح داده خواهد شد.

۱-روش انتشار از دیسک:

این روش برای نخسـتین بار توسط دانشمندانی به نام های Kirby، Bauer و Sherris در سال ۱۹۶۶ ارائه شد و به همین جهت نام دیگر روش انتشـار دیسـک، روش Kirby-Bauer اسـت. در این روش از دیسک های کاغذی آغشته به آنتی بیوتیک استفاده می شود، به همین جهت آنها را دیسک های آنتی بیوتیک می نامیم.

مراحل انجام آزمایش انتشار از دیسک:

الف- تهیه سوسپانسیون باکتری:

پس از تعیین هویت کامل یا اولیه باکتری باید سـوسـپانسیونی از آن را آماده نمود. بدین منظور با استفاده از یک لوپ یا سـواب حداقل چهار کلنی مشـابه از نمونه تعیین هویت شـده را به یک لوله آزمایش دارای محیط کشـت اسـتریل منتقل کرد. باکتری های متصل شده را باید کاملا در محیط کشت به حالت سوسپانسیون در آورد (شکل ۱).

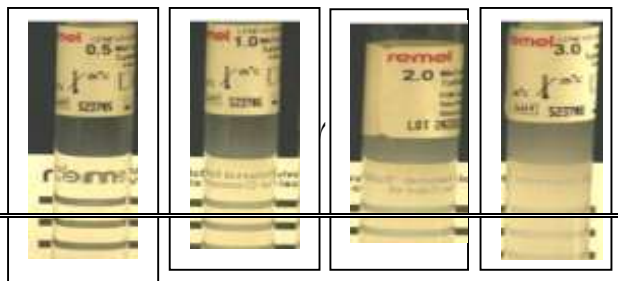
شکل ۱- روش انتخاب و برداشت کلنی باکتری مورد آزمایش در سنجش حساسیت به مواد ضد میکروبی

ب- تعیین تقریبی تعداد باکتری موجود در سوسپانسیون:

به دلیل اینکه به کار بردن تعداد کم و یا زیاد باکتری منجر به یافته های اشـتباه خواهد شـد، اسـتفاده از تعداد مناسـب باکتری مورد آزمایش بسـیار مهم اسـت. بنابراین باید پس از آماده سـازی سوسپانسیون دارای باکتری از روش کدورت سـنجی اسـتفاده کرده و تعداد تقریبی باکتری را در آن محلول مشـخص نمود. این مرحله را در اصطلاح استاندارد نمودن تعداد باکتری می گویند. برای این منظور در آزمایشگاه ها از محلول استانـدارد نیم مک فارلند (Mc.Farland ۰,۵) اسـتفاده می شـود (کادر ۱). بدین ترتیب محیط کشت مایع دارای باکتری را با مایع نیم مک فارلند مقایسه نموده و اگر از نظر کدورت مشابه هم باشند تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml (کادر ۲) از باکتری در محیط کشت خواهد بود. برای مقایسه کدورت این دو می توان از چشم غیر مسلح و یا از دستگاه های کدورت سنجی و یا اسپکتروفتومتر استفاده نمود.

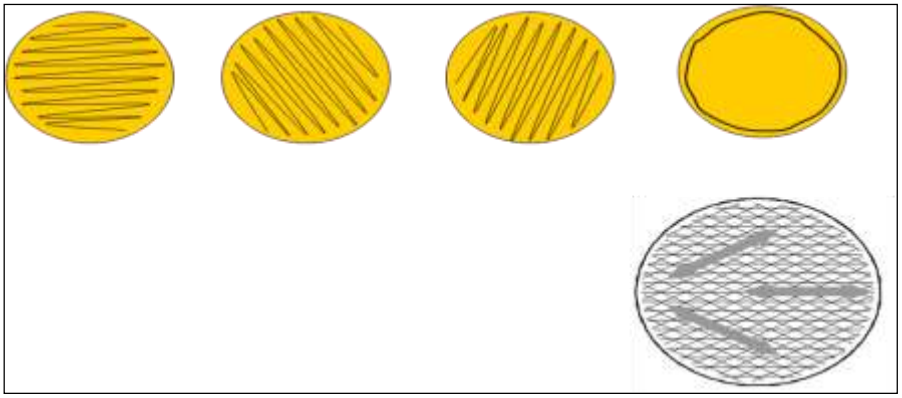
کادر۱: سوسپانسیون مک فارلند ترکیبی حاوی کلرید باریم و اسید سولفوریک است که در نسبت های مختلف با هم ترکیب می شوند. ترکیب این دو با همدیگر منجر به تشکیل محلولی کدر می گردد. هر چه میزان کلرید باریم این مجموعه بیشتر باشد میزان کدورت بیشتر خواهد بود.

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



ج- کشت دادن باکتری روی محیط مناسب:

برای انجام تست حساسیت میکروبی از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده می شود. این محیط از نظر شرایط محیط مانند pH، غلظت کاتیون ها و مقدار تایمیدین توسط کارخانه سازنده استاندارد شده است. در مورد باکتری های ســـخت گیر (Fastidious) می توان مواد افزودنی مانند خون به این محیط اضـــافه نمود. این محیط ها در اختیار شـما قرار خواهد گرفت. در این مرحله با استفاده از سواب باکتری مورد آزمایش را در محیط کشتی که به صـورت پلیت در اختیار شـما قرار گرفته است به روش spreading کشت دهید به طوری که در همه جای پلیت باکتری به صورت یکنواخت کشت شده باشد (شکل ۲- مراحل شکل ازچپ به راست است).

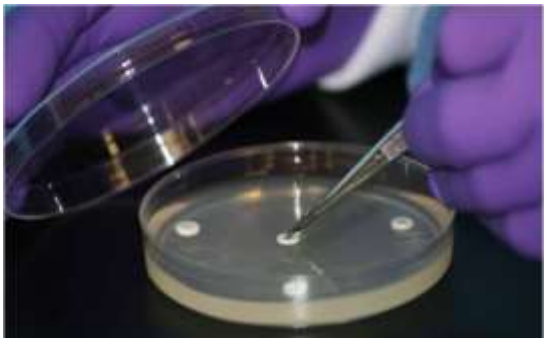


شکل ۲- از چپ به راست: سواب آغشته به باکتری مورد آزمایش را در جهت های مختلف روی سطح مولر هینتون آگار بکشید. به صورتیکه باکتری در تمام سطح آن پخش شود.

د- دیسک گذاری:

حداکثر تا پانزده دقیقه پس از تلقیح پلیت باید دیســـک های آنتی بیوتیکی را بر روی ســـطح آن قرار داد. آنتی بیوتیک ها به صـورت دیسـک در اختیار شـما قرار خواهند گرفت. غلظت مناسب دارو برای هر دیسک قبلاً توسط موسساتی مانند FDA و CLSI تعیین شده و روی هر دیسک نوشته شده است. نام آنتی بیوتیک ها نیز به صورت اختصاری روی دیسک نوشته شده است (شکل ۳). پس از کشت دادن باکتری دیسک های انتخاب شده در شرایط اسـتریل و با اسـتفاده از پنس به صـورت کاملاً تخت بر روی سطح آگار قرار داده می شود (شکل ۴). دیسک باید فقط یک بار با سطح آگار تماس یابد و از گذاشتن و برداشتن آنها خودداری کنید. پس از گذاردن همه دیسک ها آنها را با کمی فشار ثابت کنید که با وارونه کردن پلیت از سطح آگار جدا نشوند. فاصله دیسک ها از همدیگر نباید کمتر از ۱۵ میلی متر (مرکز به مرکز) باشد. دیسک ها از دیواره پلیت نیز باید ۱۲ میلی متر فاصله داشته باشند.

شکل ۳- دیسک های حاوی آنتی بیوتیک. به حروف اختصاری آنتی بیوتیک و غلضت آن بر حسب میکرو گرم توجه کنید.
= پنی سیلینP= آمیکاسین و AM= نئومایسین، N= اریترومایسین، E



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

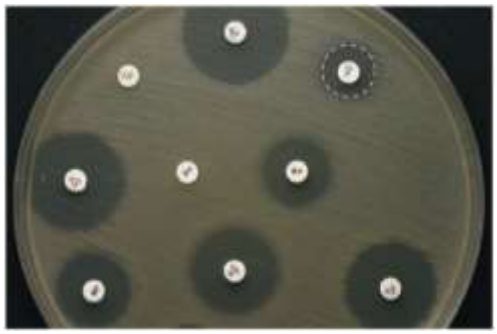
ه- انکوباسیون:

پس از دیسک گذاری پلیت را نام گذاری نموده و آنرا در داخل انکوباتور قرار دهید. در مورد بسیاری از ارگانیسم ها انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و زمان ۱۸ ساعت انجام می گردد. مواردی نیز به عنوان استثناء وجود دارد که باید بر اساس قواعد استاندارد CLSI یا سایر موسسات انکوبه گردند. روش انتشار دیسک برای ارگانیسم هائی که به زمان زیادی برای رشد نیاز دارند مناسب نمی باشد.

و- تفسیر نتایج:

پیِش از خواندن نتیجه باید پلیت را از نظر **رشد مناسب، هم گون و خالص بودن گونه باکتری** بررسی کرد (کلنی ها باید یک شکل باشند). اگر هاله نبود رشد نامشخص و درهم باشد تکرار آزمایش لازم است. در صورت خالص بودن کشت و نیز مشخص بودن هاله نبود رشد باید مراحل اندازه گیری آن انجام گیرد (شکل ۵). در مرحله اندازه گیری بدون باز کردن در پلیت و تنها از پشت پلیت و استفاده از خط کش (یا کولیس) قطر هاله نبود رشد اندازه گیری و بر اساس میلی متر ثبت می شود.

به منظور تفسیر این نتایج از جداول استانداردی که مؤسسات مختلف تهیه نموده اند استفاده می گردد (جدول ۲). با استفاده از این جداول و اندازه قطر هاله نبود رشد هر داروی ضد میکروبی، باکتری در یکی از دسته های مقاوم (Resistant)، نیمه حساس (Intermediate) و حساس (Sensitive) قرار می گیرد. این تفسیر ها بر اساس اعدادی انجام می گیرد که در آزمایشات متعدد و در نظر گرفتن بسیاری از متغیر ها به دست آمده اند. این اعداد را Breakpoint می نامند.



شکل ۵- پلیت انجام روش انتشار از دیسک پس از انکوباسیون. به خالص بودن باکتری و نیز قطر هاله نبود رشد دقت کنید.

۲- روش رقت سازی متوالی

این روش بر اساس مواجهه باکتری جداشده با رقت های متوالی داروی ضد میکروبی می باشد. در این روش لوله آزمایشی که در آن باکتری رشد قابل مشاهده را ندارد (دارای کدورت نیست) دارای اهمیت است. غلظت آنتی بیوتیک در این لوله به عنوان کم ترین غلظت آنتی بیوتیک که از رشد قابل مشاهده باکتری در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می کند در نظر گرفته می شود. این غلظت به اصطلاح Minimum Inhibitory Concentration یا MIC نامیده می شود. این قسمت در آزمایشگاه انجام نمی شود.

	Resistant	Intermediate	Susceptible
Tetracycline	<۱۴	۱۵-۱۸	>۱۹
Chloramphenicol	<۱۲	۱۳-۱۷	>۱۸
Cotrimoxazole	<۱۰	۱۱-۱۵	≥۱۶
Nitrofurantoin	<۱۴	۱۵-۱۶	>۱۷
Erythromycin	<۱۳	۱۴-۲۲	>۲۳
Gentamycin	<۱۲	۱۳-۱۴	>۱۵

شکل ۶- روش آزمایش رقت سازی متوالی. لوله ها از راست به چپ دارای رقت های یک دوم از آنتی بیوتیک می باشند. لوله پنجم از چپ و برابر ۱/۶ میکرو گرم بر میلی لیتر از MICلوله آخر به عنوان کنترل بدون آنتی بیوتیک است. میزان آنتی بیوتیک می باشد.

۳- روش انتشار گرادیانت یا ***E.test***

این روش توسط شرکتی سوئدی طراحی شده است و علت نام گذاری آن به عنوان E-test شکل بیضی مانند هاله نبود رشد می باشد. در این روش غلظت های مختلف یک ماده ضد میکروبی روی یک نوار (به صورت شیب غلظتی) تلقیح شده است (شکل ۷). در این روش پس از کشت باکتری به صورت روش انتشار از دیسک روی محیط مولر-هینتون آگار، نوارها بر روی محیط کشت قرار داده خواهند شد. مانند روش انتشار از دیسک این مر حله نیز باید در شرایط استریل انجام گیرد. نتیجه حاصل از این آزمایش نیز MIC است.در این روش عددی که در **نقطه تقاطع هاله نبود رشد بیضی شکل و نوار آنتی بیوتیکی** قرار دارد به عنوانMIC در نظر گرفته می شود(شکل ۷). این قسمت در آزمایشگاه انجام نمیشود.

شکل ۷- پلیت انجام روش انتشار گرادیانت پس از انکوباسیون. به شکل بیضی شکل هاله نبود رشد دقت کنید. در شکل سمت چپ در نظر MICتقاطع بین محل هاله نبود رشد باکتری و نوار آنتی بیوتیک که با فلش زرد رنگ نشان داده شده است به عنوان گرفته خواهد شد.

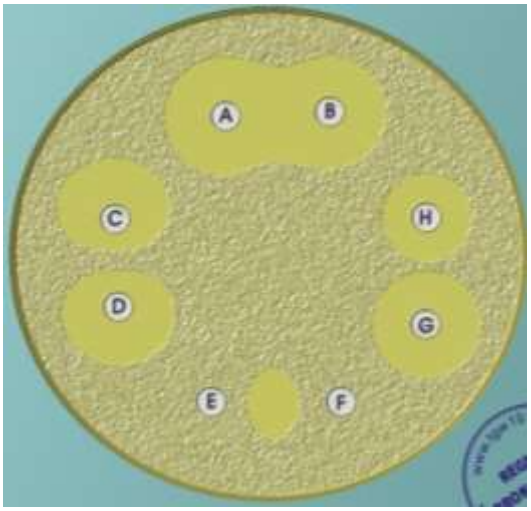
بررسی سینرژیسم:

الف- کشت: مانند روشی که در بالا توضیح داده شده است.

ب- دیسک گذاری: در این روش نیز از چند دیسک استفاده می گردد. دیسک دو آنتی بیوتیک که مورد ارزیابی سینرژیسک قرار می گیردند باید در نزدیکی یکدیگر قرار داده شوند (حداکثر ۱۰ میلی متر). مثلا دیسک های آمپی سیلین به عنوان یک بتالاکتام در کنار دیسک توبرامایسین به عنوان یک آمینوگلیکوزید.

ج- انکوباسیون: ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد

د- یافته ها و تفسیر: شعاع هاله بدون رشد هر دیسک در سمتی که دور از هم باشند اندازه گیری می گردد. در صورتیکه این عدد را در دو ضرب کنید قطر هاله بدون رشد هر یک از آنتی بیوتیک ها به تنهایی به دست خواهد آمد. سپس شعاع هاله بدون رشد در سمتی که دو دیسک به هم نزدیکند به عنوان اثرات همزمان دو آنتی بیوتیک اندازه گیری می گردد. در صورتیکه این عدد نیز در دو ضرب گردد قطر هاله بدون رشد با اثر همزمان دو آنتی بیوتیک به دست خواهد آمد. در صورتیکه قطر هاله بدون رشد در سمت نزدیک به هم از قطر هاله بدون رشد سمت دور از هم بیشتر باشد اثر سینرژیسم دو آنتی بیوتیک اثبات می گردد.



شکل ۶- پلیت انجام تست سینرژیسم. دیسک های A و B همچنین دیسک های E و F دارای اثرات سینرژیسم می باشند. دیسک های C و D دارای اثر آنتاگونیسم. دیسک های H و G دارای اثر بدون تفاوت.

مصرف سیترات توسط باکتری ها

- هدف:

شناسایی و افتراق اعضای خانواده انتروباکتریاسه

۲- اساس آزمایش:

سدیم سیترات، نمک اسید سیتریک و یک ترکیب آلی است که در سیکل کربن متابولیزه شده و می تواند منبع کربن محسوب شود.

برخی از ارگانیسم ها می توانند انرژی مورد نیاز خود را با استفاده از سدیم سیترات به عنوان تنها منبع کربن و از نمک های آمونیوم غیر ارگانیک به عنوان تنها منبع نیتروژن بدست آورند.

توجه شود که هر محیطی که برای تعیین استفاده از سیترات به کار می رود، باید فاقد پروتئین و کربوهیدرات به عنوان منابع دیگر کربن باشد.

۳- مواد و معرفها:

- کشت تازه میکروبی (کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر)

- محیط سیمون سیترات آگار Simmons Citrate agar که حاوی نمک ها،کاتیون ها، بافرهای سیترات و بروم تیمول آبی به عنوان اندیکاتور است، می تواند در pH قلیایی (بالاتر از ۷,۶) و در جریان تولید ترکیبات قلیایی (ترکیبات آمونیوم) حاصل از مصرف سیترات تولید رنگ آبی در محیط نماید.

۴- روش انجام کار:

مقدار خیلی کم از ارگانیسم مورد نظر (۲-۱ کلنی ایزوله) را در سطح آگار شیب دار سیمون سیترات تلقیح نمایید. فرو بردن سوزن مخصوص کشت، به ته لوله جهت کشت لازم نمی باشد.

سپس ۴۸-۲۴ ساعت (حد اکثر ۷ روز) لوله را در ۳۷ ˚C - ۳۵˚C انکوبه نمایید.

ایجاد رنگ آبی نشان دهنده واکنش مثبت است. گاهی ممکن است تغییر رنگ در محیط دیده نشود اما در مسیر خط کشت باکتری، رشد دیده شود که این حالت نیز مثبت در نظر گرفته می شود. بهتر است در این شرایط مجدداً با مقادیر کم باکتری، آزمایش را تکرار نمایید.

۵- تداخلات:

مقدار تلقیح باکتری باید به میزان خیلی کم باشد زیرا در غیر این صورت ترکیبات آلی موجود در دیواره باکتری های در حال تخریب، کربن و نیتروژن زیادی آزاد کرده و می توانند واکنش مثبت کاذب حاصل نمایند.

۶- برنامه کنترل کیفی داخلی:

سویه کنترل مثبت: *انتروباکتر آئروژینوزا*

سویه کنترل منفی: *E. coli* ATCC ۲۵۹۲۲

DNase Test Agar

۱- هدف:

این محیط کشت در ارزیابی فعالیت دزوکسی ریبونوکلئاز (DNase) باکتری ها و قارچ ها و خصوصاً به عنوان کمک در تشخیص استافیلوکوک های بیماریزا بکار می رود.

DNase Test Agar with Toluidine Blue برای کمک در تفکیک و تشخیص گونه سراشیای بدون پیگمان که ممکن است به اشتباه بعنوان گونه انتروباکتر و کلبسیلا تشخیص داده شوند، به کار می رود.

۲- اساس آزمایش:

اگر استافیلوکوک آنزیم DNase داشته باشد این آنزیم، اسیدنوکلئیک را هیدرولیز می نماید که با استفاده از معرف و ایجاد هاله شفاف در اطراف محل رشد باکتری می توان به این موضوع پی برد.

ویژگی های آزمایش:

حساسیت: ۹۹٪ استافیلوکوک های کواگولاز مثبت، DNase مثبت نیز هستند.

اختصاصیت:۲۰٪ استافیلوکوک های کواگولاز منفی، DNase مثبت هستند.

۳- نمونه اولیه:

پلیت های LEMB Agar یا Trypticase Soy Agar with ۵٪ Sheep Blood حاوی ارگانیسم مورد نظر

۴- مواد و ابزار مورد نیاز:

- پلیت DNase Test Agar
- معرف اسید کلریدریک ۱N (یک نرمال) یا معرف تولوئیدین بلو ۰/۱٪

توجه : پلیت های DNase Test Agar with Toluidine Blue را می توان مستقیماً بدون افزودن معرف بررسی نمود، چون خود محیط کشت حاوی ۰/۰۵ g/lit از ماده Toluidine Blue O می باشد. مقدار این ماده در محیط کشت نباید از ۰/۰۰۵ ٪ تجاوز کند چون در غلظت های بالاتر ممکن است شناسایی فعالیت DNase را مشکل سازد.

۵- روش انجام کار:

پلیت های DNase Test Agar یا DNase Agar with Toluidine Blue را با نمونه مورد نظر به صورت نقطه ای (یا خطی) تلقیح نمایید. پلیت ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۲° ± ۳۵ سانتیگراد انکوبه نمایید. پس از انکوباسیون، روی پلیت های DNase Test Agar ساده، اسید کلریدریک ۱ نرمال و یا تولوئیدین بلو ۰/۱٪ بریزید به گونه ای که سطح پلیت را کاملاً بپوشاند و سپس آن را بر روی زمینه تیره قرار داده و بررسی نمایید. تلقیح باید نقطه ای باشد، چون بعضی از سویه های استافیلوکوک اورئوس به خوبی بر روی محیط، رشد نمی کنند و در نتیجه میزان رشد برای ارزیابی

فعالیت DNase کافی نخواهد بود. در صورت تلقیح نقطه ای، حتی اگر در محل تلقیح، رشدی ایجاد نشود می توان فعالیت DNase را ارزیابی نمود.

- DNase Test Agar که اسید کلریدریک یک نرمال روی آن ریخته شده است:

a) مثبت: فوراً هاله های شفاف کاملاً مشخصی اطراف کلنی یا محل تلقیح را در محیط کشت احاطه می کنند.

b) منفی: اطراف کلنی ها یا محل تلقیح شفاف نمی شود.

- DNase Test Agar که تولوئیدین بلو ۰/۱٪ روی آن ریخته شده است:

a) مثبت: هاله های شفاف قرمز صورتی، اطراف کلنی یا محل تلقیح را احاطه می کنند. محیط در جایی که DNA باقی مانده باشد آبی می شود.

b) منفی: هاله های کدر قرمز صورتی اطراف کلنی یا محل تلقیح را احاطه می کنند.

- پس از انکوباسیون روی پلیت های DNase Test Agar With Toluidine Blue، معرف ریخته نمی شود و مستقیماً بررسی می گردد.

a) مثبت (+): هاله شفاف قرمز صورتی واضحی اطراف کلنی یا محل تلقیح را در یک محیط آبی (نیلی) احاطه می کند.

b) منفی (-): بدون تغییر، محیط به رنگ آبی تیره شفاف باقی می ماند.

۶- برنامه کنترل کیفی (QC):

DNase Test Agar:

Staphylococcus aureus ATCC ۲۵۹۲۳: رشد متوسط تا زیاد، احاطه شده با هاله شفاف صورتی تا قرمز (کنترل مثبت)

Staphylococcus epidermidis ATCC ۱۲۲۲۸: رشد متوسط تا زیاد، بدون هاله (کنترل منفی)

DNase Test Agar with Toluidine Blue:

Klebsiella pneumoniae ATCC ۳۳۴۹۵: رشد متوسط تا زیاد، بدون هاله (کنترل منفی)

Serratia marcescens ATCC ۱۳۸۸۰: رشد متوسط تا زیاد، احاطه شده با هاله صورتی شفاف (کنترل مثبت)

۷- تداخلات:

بعضی از سویه های استافیلوکوک ممکن است روی DNase Test Medium with Toluidine Blue مهار شوند. پروتئوس ولگاریس، سودوموناس آئروژینوزا و آئروموناس، واکنش های مثبت زیادی برای تولید DNase نشان می دهند.

بررسی توانائی ذوب ژلاتین توسط باکتری ها

۱- هدف:

افتراق باکتری های مولد ژلاتیناز از سایر باکتری ها

۲- اساس آزمایش:

محیط ژلاتین یک محیط افتراقی است که جهت کشف آنزیم ژلاتیناز از طریق هیدرولیز ژلاتین بکارمی رود. ژلاتین در اصل مشتق پروتئین کلاژن حیوانی است که به محیط های مختلف افزوده می شود. ژلاتین توسط آنزیم ژلاتیناز به اسیدهای آمینه سازنده اش هیدرولیز می شود و خاصیت ژلاتینی خود را از دست می دهد.

۳- نمونه اولیه:

کشت تازه ۲۴-۱۸ ساعته

۴- مواد مورد نیاز:

محیط ژلاتین مغذی در لوله

۵- نحوه انجام کار:

- در لوله های حاوی ژلاتین باید محکم بسته شده، در حرارت $^{\circ}C$ ۸-۴ یخچال نگهداری شوند. لوله ها را درست تا زمان تلقیح در یخچال نگهداری کنید.
- برای تلقیح از کشت تازه ۲۴-۱۸ ساعته (KIA یا سایر محیط های مناسب) استفاده نمایید.
- مقدار حجیمی از کلنی مورد نظر را تا عمق ۲/۵ – ۱/۵ سانتی متری لوله فرو ببرید.
- لوله تلقیح نشده ای را به عنوان لوله کنترل در کنار لوله آزمایش قرار دهید. هر ۲ لوله را در حرارت $^{\circ}C$ ۳۵ یا در صورت رشد بهتر در $^{\circ}C$ ۲۵- ۲۲، در این دما به مدت ۱۴-۱ روز انکوبه کنید. لوله ها را تا ۲ هفته هر روز بررسی کنید مگر اینکه در زمان زودتری عمل ذوب انجام پذیرد.
- در صورت وجود علائمی از ذوب، هر ۲ لوله را به مدت ۲ ساعت در یخچال یا حمام یخ قرار دهید تا مشخص شود که آیا هضم ژلاتین صورت گرفته است یا خیر.
- روزانه لوله ها را از انکوباتور بیرون آورده و بمدت ۲ ساعت در یخچال قرار دهید. انتقال لوله ها از انکوباتور به یخچال بدون تکان دادن لوله ها انجام گیرد. گاهی مقدار اندکی هضم ژلاتین تنها در محل تلقیح باکتری ایجاد می گردد.
- ممکن است گهگاه انکوباسیون طولانی تری (۳۰ روز تا ۶ هفته) مورد نیاز باشد ولی برای آزمایشات روزانه نتیجه آزمایش (ذوب یا عدم ذوب) در پایان ۲ هفته انکوباسیون در $^{\circ}C$ ۳۵ باید گزارش گردد.

۶- کنترل کیفی:

❖ میکروارگانیسم های هوازی

رشد و ذوب: *پروتئوس ولگاریس* ATCC ۸۴۲۷

رشد و عدم ذوب: *E. coli* ATCC ۲۵۹۴۴

❖ میکروارگانیسم های بیهوازی

رشد و ذوب: *باکتروئید فراژیلیس* ATCC ۲۵۲۸۵

رشد و عدم ذوب: *کلستریدیوم پرفرنژنس* ATCC ۱۲۹۲۴

Kligler Iron Agar

۱- هدف:

تفکیک اعضاء خانواده انتروباکتریاسه بر پایه توانایی در تخمیر دکستروز (گلوکز) و لاکتوز و تجزیه سولفیدها

۲- اساس آزمایش:

محیط کشت KIA، علاوه بر کازئین و پپتون های گوشت (Meat Peptones)، محتوی لاکتوز و دکستروز است که و در طی تخمیر این قندها به واسطه تغییر رنگ معرف pH (فنل رد) در پاسخ به اسید تولید شده، قادر است گونه باسیل های روده ای را تفکیک نماید. غلظت دکستروز فقط در این محیط ۰٫۱٪ غلظت لاکتوز است. ترکیب سیترات آمونیم فریک و تیوسولفات سدیم، شناسایی تولید سولفید هیدروژن را میسر می سازد.

توجه: به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت شود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله حدودا ۳ سانتی متر باشد.

۳- نمونه اولیه:

کشت ارگانیسم مورد نظر بر روی محیط پلیتی روده ای یا کشت Broth خالص

۴- مواد مورد نیاز:

لوله محیط کشت KIA بصورت شیب دار

۵- روش انجام کار:

محیط کشت را با مقدار زیادی از کلونی باکتری مورد نظر، با کشت مارپیچی روی تمام سطح شیب دار و سپس سوراخ کردن عمق آگار (و یا بالعکس) تا فاصله ۵-۳ میلی متری عمق لوله، تلقیح نمایید. لوله ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت و در صورت عدم واکنش تا ۴۸ ساعت ، در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ در شرایط هوازی انکوبه نمایید. بعد از انکوباسیون، نتیجه واکنش در سطح شیب دار و عمق را ثبت نموده، تشکیل گاز و تولید سولفید هیدروژن را یادداشت نمایید.

غیرتخمیرکننده های لاکتوز (مثل سالمونلا و شیگلا) در ابتدا رنگ زرد تولید می کنند که ناشی از اسید تولید شده به دلیل تخمیر مقدار کمی دکستروز است. وقتی دکستروز تمام می شود در سطح محیط شیب دار (منطقه هوازی)، به علت اکسیداسیون اسیدها واکنش به حالت قلیایی (سطح قرمز) برمی گردد. این تغییر رنگ در عمق (منطقه بی هوازی) رخ نمی دهد، پس اسیدی (عمق زرد) باقی می ماند.

تخمیرکننده های لاکتوز سطح و عمق زرد تولید می کنند، چون اسید کافی در سطح شیب دار تولید می شود تا pH اسیدی را تحت شرایط هوازی حفظ کند. ارگانیسم هایی که توانایی تخمیر هیچ یک از دو کربوهیدرات را ندارند، سطح و عمق قرمز تولید می کنند.

تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رنگ سیاه در تمام عمق یا با تشکیل حلقه سیاه در نزدیکی عمق اثبات می شود. تولید گاز با ایجاد حباب یا با شکافتن یا جابجا شدگی آگار نشان داده می شود.

۶- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانیسم	سطح شیب دار	عمق	سولفیدهیدروژن (H_2S)
Escherichia coli ATCC ۲۵۹۲۲	اسیدی	اسیدی با گاز	–
Salmonella typhimurium ATCC ۱۴۰۲۸	قلیایی	اسیدی با گاز	+
Shigella flexneri ATCC ۱۲۰۲۲	قلیایی	اسیدی	–
Pseudomonas aeruginosa	قلیایی	قلیایی	–
Citrobacter freundii	اسیدی	اسیدی	+

۷- تداخلات:

- سولفات فروس موجود در این محیط به عنوان معرف H_2S گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H_2S در TSI و KIA با سایر محیط های کشت مثل SIM مغایرت هایی دیده شود.
- برای بالا بردن شرایط قلیایی در سطح شیب دار باید با شل کردن در پیچ لوله، اجازه داده شود تا تبادل هوا صورت گیرد. اگر در پیچ لوله محکم بسته شود، یک واکنش اسیدی که فقط با تخمیر دکستروز ایجاد شده، سطح شیب دار را نیز دربرمی گیرد.
- عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز، اسیدی می شود و در صورت تولید H_2S، اغلب سیاه شدن از ته لوله شروع می شود، (بویژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.

بررسی حرکت باکتری ها

۱- هدف آزمایش:

افتراق باکتری های مختلف براساس توانایی حرکت آنها

۲- اصول انجام کار:

این آزمایش جهت افتراق ارگانیسم های متحرک از غیر متحرک به کار می رود. باکتری ها توسط فلاژل حرکت می کنند. فلاژل اغلب در باسیل ها دیده می شود، هر چند که تعداد اندکی از کوکسی ها نیز متحرکند. گاه باکتری های متحرک واریانت های غیر متحرک ایجاد می کنند که ممکن است در نهایت به فرم متحرک بر گردند. ارگانیسم های غیر متحرک فلاژل ندارند.

۳- نمونه اولیه:

کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته

۴- مواد و ابزار لازم:

- جهت انجام روش قطره معلق مواد و وسایل زیر مورد نیاز است:

۱- اسلاید (لام)

۲- لامل

۳- خمیر هماتوکریت

۴- سرم فیزیولوژی

- جهت بررسی حرکت در محیط نیمه جامد از لوله حاوی محیط SIM یا Motility test medium (Semisolid) یا محیط های مشابه می توان استفاده نمود.

۵- روش کار:

قطره معلق

۱- یک قطره سرم فیزیولوژی یا آب مقطر روی لامل قرار دهید.

۲- با استفاده از آنس از رأس کلنی های تازه باکتری، مقدار اندکی برداشته با قطره فوق مخلوط نمایید.

۳- با استفاده از خمیر هماتوکریت یا پنبه، حلقه ای به ضخامت تقریبی۲ میلی متر و به قطر تقریبی ۱-۱/۵ cm روی لام درست کنید.

۴- لامل حاوی سوسپانسیون میکروبی را به شکلی که با خمیر یا پنبه تماس پیدا نکند (به سرعت) روی لام برگردانید.

۵- نمونه فوق را زیر میکروسکوپ با عدسی ۴۰ مشاهده نمایید.

تفسیر : افتراق حرکت باکتری از حرکت براونی حائز اهمیت است. در صورت متحرک بودن باکتری، هریک از باکتریها نسبت به باکتری های همجوار در حال تغییر موقعیت مداوم هستند و بعضا با سرعت زیاد در میدان دید میکروسکوپ حرکت می کنند. این حرکت ممکن است به شکلهای مختلف از چرخش، خم و راست شدن و حرکت سریع مانند گلوله یا تیر دیده شود. در حرکت براونی، عده زیادی از باکتریها بدون چرخش و تغییر موقعیت و همگی در یک مسیر حرکت می نمایند (حرکت کاذب).

محیط های نیمه جامد

جهت تلقیح ارگانیسم در محیط های مربوطه (SIM یا MTM) از کشت خالص ۲۴-۱۸ ساعته بر روی محیط KIA یا سایرمحیط های مناسب استفاده شود.

با استفاده از آنس تلقیح، مرکز محیط را سوراخ کرده تا عمق ۱cm فرو ببرید. محیط مربوطه را در حرارت ۳۵^{o}C به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه کرده در صورت منفی بودن به مدت ۷ روز در حرارت اتاق ۲۵ ^{o}C-۲۱ نگهداری کنید. حرارت انکوباسیون اهمیت فوق العاده زیادی دارد. چون بسیاری از ارگانیسم های متحرک در ۲۵ ^{o}C-۱۵ متحرک بوده و در حرارت ۳۷ ^{o}C که حرارت مطلوب رشد آنهاست غیر متحرکند. اگر به متحرک بودن ارگانیسم در حرارت

پائین تر مشکوک هستید، ۲ لوله را همزمان تلقیح کنید، یکی را در حرارت ^{o}C ۳۵ و دیگری را در ^{o}C ۲۵ -۲۱ نگهداری نمائید.

تفسیر:

در صورت متحرک بودن باکتری (حرکت مثبت) علاوه بر رشد در خط تلقیح، محیط اطراف این خط نیز رشد واضح و یا کدورت نشان میدهد.

انکوباسیون در حرارت های مختلف:

- انکوباسیون در حرارت ^{o}C ۳۷

a- انتروباکتر (معمولا +) کلبسیلا (ـ)

b- ویبریو (معمولا +) اکتینوباسیلوس (-)

c- آئروموناس مدیا (-) و آئروموناس سالمونی سیدا (-) سایر گونه های آئروموناس (+) و پلزیوموناس شیگلوئیدس (+)

- انکوباسیون در حرارت $^{\circ}C$ ۲۵ (حرارت اتاق)

جهت کمک در افتراق بین جنس ها: لیستریامونوسیتوژن (+) کورینه باکتریوم معمولاً (ـ)

در صورت نیاز از املاح تترازولیوم در محیط مربوطه استفاده کنید، هر چند ممکن است این ماده رشد گروهی از ارگانیسم ها را مهار کند. نمک های تترازولیوم بی رنگ اند ولی با رشد ارگانیسم، رنگ به سلول ها چسبیده و به پیگمان قرمز رنگ نامحلولی به نام فورمازان احیا می شود. رنگ قرمز صرفاً در نواحی از محیط که باکتری در آن رشد کرده ایجاد خواهد شد.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون، میزان مثبت شدن "حرکت " بر روی محیط نیمه جامد مشابه قطره معلق خواهد بود. اما بعد از گذشت ۴۸ ساعت، میزان مثبت شدن واکنش حرکتی در محیط نیمه جامد در ۴٪ موارد بیشتر خواهد بود.

۶- برنامه QC:

حرکت مثبت: *E. coli* ATCC ۲۵۹۲۲

حرکت منفی : *Staphylococcus aureus* ATCC ۲۵۹۲۳

درصورت استفاده از محیط های نیمه جامد جهت کنترل منفی می توان از روش عدم تلقیح میکروب استفاده کرد.

Methyl Red Test

۱- هدف:

تشخیص و تمایز اعضای خانواده انتروباکتریاسه براساس میزان فرآورده نهائی ناشی از متابولیسم گلوکز و تولید اسید از طریق مسیر Mixed Acid Fermentation

۳- اساس آزمایش:

معرف متیل رد یک اندیکاتور pH است که در محدوده بین pH= ۶ (زرد) و pH= ۴,۴ (قرمز) واکنش نشان می دهد. اسیدیته ای که در آن معرف متیل رد قادر است تا تغییر رنگ ایجاد نماید بسیار کمتر از سایر معرفهای بیولوژیکی بوده و تنها در مجاورت اسیدیته بالا، در مسیر تخمیر چند اسید از گلوکز می تواند ایجاد واکنش نماید.

برخی از انتروباکتریاسه فقط در ابتدای دوره انکوباسیون تولید اسید می نمایند ولی تنها باکتریهایی که قادر باشند برای مدت طولانی طی انکوباسیون (۷۲-۴۸ ساعت) pH محیط را در حد پایین حفظ نمایند دارای واکنش مثبت می باشند.

۳- نمونه اولیه:

کشت خالص و تازه از باکتری مورد نظر (کشت ۲۴ -۱۸ ساعته)

۴- مواد و معرفها:

- MR/VP Broth با pH نهایی ۶/۹
- معرف متیل رد که عبارت است از ۰,۱ g پودر متیل رد در ۳۰۰ ml الکل اتیلیک ۹۵٪ و ۲۰۰ ml آب مقطر

توجه: ابتدا پودر متیل رد را باید در الکل حل نمود و سپس آب به آن اضافه کرد. محلول تهیه شده را باید در شیشه تیره و در یخچال نگهداری نمود. جهت مصرف روزانه و هفتگی آنرا در لوله های در پیچ دار به حجم ۲/۵میلی لیتر ریخته و در یخچال بگذارید.

۵- روش انجام آزمایش:

- ابتدا چند کلنی از کشت خالص باکتری را در لوله حاوی ۲/۵ میلی لیتر MR/VP Broth تلقیح نمایید.
- ۷۲-۴۸ ساعت (حداکثر ۵ روز) در $35^{\circ}C$ انکوبه نمائید.
- سپس ۵ قطره از معرف متیل رد را به Broth اضافه نمایید و نتیجه واکنش را بر اساس تغییر رنگ حاصله بررسی کنید.

ایجاد رنگ زرد ⟵ واکنش منفی

ایجاد رنگ قرمز ⟵ واکنش مثبت در نتیجه تولید اسید زیاد و ایجاد $pH<4,5$ است.

ایجاد رنگ نارنجی ⟵ واکنش منفی

جهت کوتاه تر کردن زمان نتیجه گیری می توان حدود ۰/۵ میلی لیتر MR/VP Broth را در لوله ای ریخته و مقدار نسبتاً زیادی از میکروب را در آن تلقیح نمود و پس از انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعته در $35^{\circ}C$ ، ۲-۱ قطره معرف متیل رد را به آن اضافه کرده، واکنش را مشاهده نمود.

۶- برنامه کنترل کیفی:

کنترل مثبت: *E. coli* ATCC ۲۵۹۲۲

کنترل منفی: انتروباکتر آئروژینوزا ۱۳۰۴۸، *Klebsiella Pneumoniae* ATCC ۱۳۸۸۳

توجه : در هر روز کاری، قبل از انجام آزمایش، کنترل کیفی باید با سویه های مثبت و منفی انجام شود.

فنیل آلانین دآمیناز

۱- هدف:

کمک در تشخیص پروتئوس، مورگانلا و پرووِیدنسیا از سایر باکتری های گرم منفی

۲- اساس آزمایش:

فنیل آلانین اسید آمینه ای است که ضمن دآمنیه شدن به فنیل پیرووِیک اسید تبدیل می شود، این اسید با افزودن کلرورفریک ۱۰٪ و ایجاد رنگ سبز مشخص می شود.

۳- مواد و ابزار لازم :

- لوله حاوی فنیل الانین آگار
- کلرورفریک ۱۰ درصد

۴- مراحل انجام کار:

- سطح محیط با کلنی ایزوله تلقیح شده ، در لوله به صورت شل بسته شود.

- بعد از انکوباسیون محیط در c °۳۵به مدت ۲۴-۱۸ ساعت یا تا هرزمان که رشد واضحی مشاهده گردد ، (۰/۵cc) ۵-۴ قطره کلرورفریک ۱۰٪ مستقیماً به سطح آگار اضافه می کنیم. لوله را می چرخانیم تا کلنی ها در آن غوطه ور شوند.

۵- تفسیر:

ظهور بلافاصله رنگ سبز بعد از ریختن معرف، بیانگر مثبت بودن این تست است. در عرض ۱۰ دقیقه رنگ سبز، کم رنگ تر می شود، که با افزودن مقادیر اضافی معرف، دوباره رنگ سبز ایجاد می شود.

بعضی گونه ها به قدری سریع فنیل آلانین را دآمینه می کنند که بعد از ۴ ساعت انکوباسیون محیط کشت، نیز تست مثبت می شود.

۶- کنترل کیفی:

کنترل مثبت: پروتئوس ولگاریس ATCC ۳۳۴۲۰

کنترل منفی: Ecoli ATCC ۲۵۹۲۲

- کنترل کیفی فوق باید برای هر سری ساخت جدید محیط یا معرف انجام گیرد.

PYR

۱- هدف:

تست با حساسیت بالا جهت تشخیص استرپتوکوک های گروهA و انتروکوک های گروه D

۲- اساس آزمایش:

آنزیم آمینو پپتیداز توسط سوبسترایی به نام L-pyrolidonyl-β-naphthylamide هیدرولیز می شود و در نتیجه β-naphthylamide آزاد می شود که با افزودن

N,N-dimethylaminocinnamaldehyde و با ایجاد رنگ قرمز مشخص می شود.

۳- نمونه اولیه:

- کشت تازه میکروبی (۲۴-۱۸ ساعته)

۴- مواد و ابزار لازم:

- PYR Broth (Todd Hewitt Broth با پیرولیدونیل بتا نفتیل آمید ۰/۰۱٪) به مقدار ۰/۲ ml در لوله)
- معرف PYR (دی متیل آمینو سینامالدئید ۰/۰۱٪)
- لوله آزمایش

۵- روش انجام آزمایش:

- ابتدا ۲ تا ۳ کلنی ازکشت مورد نظر را در لوله محتوی PYR Broth ۰,۲ ml حل می کنیم.
- لوله را به مدت ۴ ساعت در حرارت ۳۵°C انکوبه می کنیم.
- یک قطره معرف PYR به آن اضافه می نماییم.
- سرانجام واکنش را که بر اساس تغییر رنگ می باشد مشاهده و تفسیر می نماییم.
- زمان لازم برای خواندن نتایج یک دقیقه می باشد که رنگ زرد یا عدم تغییر رنگ نشانگر منفی بودن تست و ایجاد رنگ قرمز پررنگ نشانگر واکنش مثبت است.

۶- کنترل کیفی:

سوش کنترل مثبت: *Streptococcus pyogenes* ATCC ۱۹۶۱۵

سوش کنترل منفی: *Streptococcus agalactiae* ATCC ۱۳۸۱۳ و *انتروکوک فکالیس*

در هر روز کاری، قبل از انجام آزمایش، کنترل کیفی باید با سوش های مثبت و منفی انجام شود.

۷- تداخلات:

قبل از انجام این آزمایش باید مطمئن بود که ارگانیسم مورد نظر استرپتوکوک است یعنی کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی در اختیار داریم. زیرا ارگانیسم های دیگر مانند بعضی از کوکسی ها، استافیلوکوک ها و استرپتوکوک های ویریدنس نیز PYR مثبت هستند.

حساسیت به باسیتراسین و SXT

۱- هدف:

تشخیص استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A از سایر استرپتوکوک ها

۲- اساس آزمایش:

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A به دیسک باسیتراسین ۰,۰۴Uحساس ولی به تریمتوپریم ـ سولفامتوکسازول (SXT) ۱,۲۵Ug مقاوم است. استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه B به هر ۲ آنتی بیوتیک مقاوم است.

۳- ویژگی های تست:

بیش از ۱۰٪ سویه های گروه C و G به باسیتراسین حساسند بنابراین این تست جهت گروه A چندان اختصاصی نیست. به همین دلیل، این تست اغلب همراه با تست حساسیت به SXT انجام می شود که گروه هایC و G عموماً به آن (SXT) حساس بوده و گروه های A و B مقاومند.

۴- نمونه اولیه:

کشت ۲۴ – ۱۸ ساعته از باکتری مورد نظر

۵- لوازم و ابزار مورد نیاز:

-بلاد آگار با خون گوسفند

-دیسک باسیتراسین (۰,۰۴ U)

-دیسک SXT

-پنس استریل

-سواب استریل

۶- روش انجام کار:

کلنی ایزوله استرپتوکوک بتاهمولیتیک را در وسط یک پلیت بلادآگار قرار داده و سپس با یک سواب یا لوپ استریل آن را بطور یکنواخت روی پلیت کشت می دهیم. یک دیسک باسیتراسین و یک دیسک SXT را روی ناحیه کشت داده شده، قرار می دهیم. باید توجه نمود که دیسک ها از همدیگر فاصله داشته باشند. پلیت را دراتووC° ۳۵ قرار می دهیم.

حساس = عدم رشد در اطراف دیسک ها

مقاوم = رشد تا لبه دیسک ها

۷- برنامه QC:

ATCC ۱۹۶۱۵ استرپتوکوک گروه A : باسیتراسین = S و R = SXT

ATCC ۲۷۹۵۶ استرپتوکوک گروه B : باسیتراسین = R و R = SXT

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروههای C و F یا G: باسیتراسین = S و S= SXT

۸- تداخلات:

- این تست تنها باید برای تشخیص استرپتوکوک های بتاهمولیتیک انجام شود زیرا بعضی از استرپتوکوک های آلفاهمولیتیک (مثل پنوموکوک) به باسیتراسین حساسند.
- کشت روی بلاد آگار باید کاملاً یکنواخت و به مقدار کافی انجام شود. تلقیح کم میکروارگانیسم روی بلادآگار باعث می شود استرپتوکوک non-A به باسیتراسین حساس شود و نتیجه مثبت کاذب دهد.

محیط TCBS Agar

۱- هدف:

جداسازی انتخابی ویبریوهای کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس

۲- اساس آزمایش:

TCBS آگار Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar محیطی انتخابی برای جداسازی ویبریوکلرا و ویبریوپاراهمولیتیکوس و نیز دیگر ویبریوها است.

- مهار باکتری های گرم مثبت با افزودن Oxgall (صفرای گاوی، محتوی مخلوطی از نمک های صفراوی و Sodium Cholate) انجام می شود.
- تیوسولفات سدیم به عنوان منبع سولفور عمل می کند و در ترکیب با سیترات فریک، تولید سولفید هیدروژن می کند.
- ساکاروز بعنوان کربوهیدرات قابل تخمیر برای متابولیسم ویبریوها موجود است.
- pH قلیائی محیط، جداسازی ویبریوکلرا را افزایش می دهد. تیمول بلو و برم تیمول بلو به عنوان معرف های تغییر pH موجودند.

۳- نمونه اولیه :

- سواب های محتوی ماده نمونه در محیط کشت انتقالی کری ـ بلر (Cary & Blair)

۴- مواد و ابزار لازم :

- آب پپتونه قلیایی
- محیط کشت TCBS

۵- روش انجام کار:

حتی الامکان به محض دریافت نمونه، آن را کشت دهید. نمونه هایی مثل سوابهای مقعد، مدفوع، ماده استفراغ شده، ماهی یا غذاهای دیگر را می توان با سواب به طور مستقیم روی محیط تهیه شده در پلیت برد. تلقیح زیاد، مخصوصاً اگر نمونه ها تازه نیستند، توصیه می شود. اگر تأخیری در رسیدن نمونه به آزمایشگاه پیش بینی می شود، سواب های محتوی ماده نمونه را باید در محیط انتقالی کری ـ بلر به آزمایشگاه منتقل نمود.

برای جداسازی ویبریوکلرا و دیگر گونه های ویبریو از مدفوع، آب پپتونه قلیایی و TCBS به کار می رود. یعنی نمونه را ابتدا داخل آب پپتونه قلیایی حاوی ۱٪ NaCl (pH = ۸/۵) برده و به مدت ۸-۵ ساعت در دمای ۳۵ $^{\circ}$ C انکوبه نمایید و سپس روی محیط TCBS کشت دهید.

اما در مواقع اورژانس و کمبود وقت توصیه می شود قبل از قرار دادن سواب در آب پپتونه قلیایی, سواب را بر روی یک پلیت TCBS بکشید, پلیت را کشت داده و انکوبه نمایید و سپس سواب را در آب پپتونه قلیایی برده و به مدت ۸-۵ ساعت در دمای ۳۵ $^{\circ}$ C انکوبه نمایید و پس از آن ساب کالچر مجددی بر روی پلیت TCBS تهیه نمایید.

پلیت ها را دور از نور نگهداشته و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵± ۲ $^{\circ}$ C انکوبه نمایید. اگر بعد از ۲۴ ساعت منفی بود برای ۲۴ ساعت دیگر انکوبه نمایید.

- *توجه : از زمان تهیه محیط TCBS نباید بیش از یک هفته گذشته باشد. همچنین محیطهای TCBS باید در کیسه های فریزر در بسته در یخچال نگهداری شوند.*

نکته: برای کشت ویبریوها نباید نمونه ها را فریز کرد.

۶- برنامه کنترل کیفی (QC):

Vibrio Cholerae ATCC ۹۴۵۹: رشد متوسط تا زیاد، کلونی های زرد

Vibrio parahaemolyticus ATCC ۱۷۸۰۲: رشد متوسط تا زیاد، کلونی های آبی

Escherichia coli ATCC ۲۵۹۲۲: اگر رشد کند،کلونی ها کوچک و شفاف هستند.

Pseudomonas aeruginosa ATCC ۱۰۱۴۵: رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند، کلونی ها آبی هستند.

Streptococcus faecalis ATCC ۲۹۲۱۲: رشد به طور جزئی یا کامل مهار می شود. اگر رشد کند، کلونی ها کوچک و زرد هستند.

Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)

۱- هدف:

تفکیک باسیل های روده ای گرم منفی (بر اساس تخمیر کربوهیدرات و تولید سولفید هیدروژن)

۲- اساس آزمایش:

در این محیط کشت، ساکاروز به دو قندی (دکستروز و لاکتوز) که در محیط کلایگلر آیرون آگار (KIA) وجود دارد، اضافه می‌شود. افزودن ساکاروز، با تسهیل در جداسازی باسیل های تخمیر کننده ساکاروز و نیز تخمیر کننده های لاکتوز و یا دکستروز، حساسیت محیط را افزایش می دهد. تخمیر کربوهیدرات، با تغییر رنگ قابل مشاهده معرف pH یعنی فنل رد (از قرمز به زرد) نشان داده می شود. تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رسوبی که محیط را در عمق لوله سیاه می کند و نتیجه افزودن سولفات فروس به محیط است، نشان داده می شود.

برای تسهیل در جداسازی ارگانیسم‌هایی که فقط دکستروز را تخمیر می کنند، غلظت دکستروز یک دهم (۰/۱) غلظت لاکتوز یا ساکاروز است. مقدار کم اسید تولید شده در سطح شیب دار لوله در طی تخمیر دکستروز، به سرعت اکسید می شود و باعث می شود محیط به pH قلیایی(قرمز) برگردد. در مقابل، بدلیل فشار پایین تر اکسیژن در عمق، واکنش اسیدی (زرد) حفظ می شود.

توجه: به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت نمود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله، حدوداً ۳ سانتی متر باشد.

۳- نمونه اولیه :

- کشت ارگانیسم بر روی یک پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه

۴- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

- لوله محیط کشت TSI بصورت شیب دار

۵- روش انجام کار:

با استفاده از آنس سوزنی استریل خنک، رشد را از مرکز یک کلونی که به تازگی روی پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه رشد کرده است، به سطح شیب دار TSI Agar انتقال دهید و آن را با حرکت آنس در امتداد سطح شیب دار، کشت دهید و سپس عمق را با سوراخ کردن محیط، تلقیح نمایید. لوله ها را با در پوش های شل شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای $35 \pm 2^{\circ} C$ در اتمسفر هوازی انکوبه نمایید.

واکنش های تولید شده توسط ایزوله مجهول را با ارگانیسم های کنترل، مقایسه نمایید. تخمیر کربوهیدرات با رنگ زرد محیط نشان داده می شود.

اگر محیط در عمق لوله زرد شود (اسیدی) اما در سطح شیب دار قرمز شود (قلیایی)، ارگانیسم تحت بررسی فقط دکستروز (گلوکز) را تخمیر می کند.

رنگ زرد (اسیدی) در سطح شیب دار و عمق نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، دکستروز، لاکتوز و یا ساکاروز را تخمیر می کند.

رنگ قرمز (قلیایی) در سطح شیب دار و عمق، نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، یک غیر تخمیر کننده (Nonfermenter) است.

تولید سولفید هیدروژن سبب تولید رسوب سیاه در عمق لوله می شود.

تولید گاز با شکاف و ترک خوردگی محیط نشان داده می شود.

۶- برنامه کنترل کیفی (QC):

ارگانیسم	سطح شیبدار	عمق	گاز	H_2S
Escherichia coli ATCC ۲۵۹۲۲	A	A	+	-
Pseudomons aeruginosa ATCC ۲۷۸۵۳	K	K	-	-
Salmonella typhimurium ATCC ۱۴۰۲۸	K	A	+	+
Shigella flexneri ATCC ۱۲۰۲۲	K	A	-	-

A: اسیدی (زرد) K: قلیایی (قرمز)

۷- تداخلات:

- برای حفظ شرایط قلیایی سطح شیب دار باید با بستن درپیچ لوله بصورت شل، اجازه داد که تبادل آزاد هوا صورت گیرد. اگر لوله محکم بسته شود، واکنش اسیدی (ایجاد شده فقط با تخمیر دکستروز) سطح شیب دار را درگیر خواهد کرد.
- بعضی از ارگانیسم ها ممکن است تولید سولفید هیدروژن را روی KIA نشان دهند، اما روی TSI نشان ندهند، چون استفاده از ساکاروز در TSI Agar، مکانیسم آنزیمی را که در تولید H_2S اثر می گذارد مهار می کند. بویژه سالمونلای تولید کننده H_2S و بعضی از اعضاء انتروباکتریاسه نمی توانند روی TSI Agar، H_2S تولید کنند.
- سولفات فروس موجود در این محیط(به عنوان معرف H_2S) گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H_2S در TSI و KIA با سایر محیط های کشت مثل SIM مغایرت هایی دیده شود.

چون عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز اسیدی می شود ، سیاه شدن اغلب در ته لوله وجود دارد یا به همان جا محدود می شود (بویژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.

اوره آز

۱- هدف:

افتراق انتروباکتریاسه ها، افتراق بین گونه های بروسلا، شناسایی گونه های مهمی نظیر کورینه باکتریوم اوره آ لیتیکوم، هلیکوباکترپیلوری، تشخیص مخمرهای کپسول دار و به عنوان یک تست اضافی برای تشخیص بعضی کوکوباسیل های گرم منفی

۲- اساس آزمایش:

اوره آز آنزیمی است که بعضی از ارگانیسم ها آن را تولید کرده و اوره را به دی اکسید کربن، آب و آمونیاک هیدرولیز می کنند. آمونیاک در محلول به کربنات آمونیوم تبدیل شده و باعث قلیایی شدن محیط و بالا رفتن pH می شود.

۳- نمونه اولیه:

کشت ۲۴ – ۱۸ ساعته از ارگانیسم مورد نظر

۴- مواد و تجهیزات مورد نیاز:

محیط کشت مایع نظیر Stuart's urea broth یا محیط کشت آگار مانند Christensen's urea Agar

۵- مراحل انجام کار:

۵-۱) محیط کشت Broth یا سطح شیبدار محیط کشت جامد را با مقدار نسبتاً زیادی از کلنی های ایزوله تلقیح می کنیم.

۵-۲) هر دو لوله محیط کشت را با در پیچ شل به مدت ۴۸ ساعت تا هفت روز در $35^{\circ}C$ انکوبه می نماییم.

ارگانیسم هایی که اوره را سریع هیدرولیز می کنند، در عرض ۲-۱ ساعت واکنش مثبت می دهند و سویه هایی که کمتر فعالند، به ۳ روز یا بیشتر انکوباسیون نیاز دارند.

۵-۳) واکنش ها بدین صورتند :

a. **اوره براث**:

- ایجاد رنگ قرمز نشان دهنده واکنش قلیایی و هیدرولیز اوره می باشد.

b. **اوره آگار**:

- سوش های اوره آز مثبت سریع : ایجاد رنگ قرمز در تمام محیط
- سوش های اوره آز مثبت ضعیف : ایجاد رنگ قرمز ابتدا فقط در سطح و بتدریج در عمق لوله
- سوش های اوره آز منفی : محیط کشت به رنگ اولیه خود باقی می ماند.

۶- برنامه QC :

هر batch جدید از محیط کشت باید با ارگانیسم های کنترل مثبت و منفی تست شود.

سوش کنترل مثبت: Proteus sp

سوش کنترل مثبت ضعیف: Klebsiella sp

سوش کنترل منفی: E. coli

توجه:

باید به اهمیت تفاوت محیط کشت اوره Broth و اوره آگار توجه شود. از آنجا که اوره Broth حاوی مقدار زیادی از بافر نمک های فسفات با pH = ۶/۸ می باشد برای از بین بردن اثر بافر باید مقدار نسبتا زیادی آمونیاک توسط باکتری ایجاد شود تا pH محیط به بالای ۸ برسد و تغییر رنگ ایجاد شود.

محیط اوره آگار حاوی مقدار کمتری بافر نسبت به اوره Broth می باشد و پپتون و گلوکز دارد. این محیط غنی بوده و رشد بسیاری از باکتری هایی را که نمی توانند در اوره براث رشد کنند، افزایش می دهد. از طرفی کم بودن مقدار

بافر در اوره آگار اجازه می دهد که مقدار کم آمونیاک حاصل از هیدرولیز اوره توسط باکتری های اوره آز ضعیف، مشخص شود. باکتری هایی که اوره آز کمی ایجاد می کنند مثل گونه هایی از کلبسیلا و آنتروباکتر و بروسلا در محیط اوره آگار، تست می شوند.

منابع:

۱. محیط های کشت آزمایشگاهی (موارد مصرف و کنترل کیفی) به انضمام اطلس رنگی محیط های کشت؛ گردآوری و ترجمه مهناز صارمی، محمدعلی صارمی؛ آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ ۱۳۸۷

۲. Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media-Second Edition; Approved Standard-Third edition document M۲۲-A

۳. Vol. ۲٤, No.۱۹; ۲۰۰٦,۳-Oxoid Company-General Guide to the use of Oxoid culture Media.

٤. Microbiological culture media; Second Edition; Becton, Dickinson and Company; ۲۰۰۹.

٥. Biochemical tests for identification of medical bacteria; MacFaddin Jean F; Lippincott Williams & Wilkins; ۲۰۰۰.

٦. Practical Medical Microbiology; Thirteenth Edition; Mackie & McCartney; Churchill Livinstone; ۱۹۸۹

۷. The global governance of antimicrobial resistance: a cross-country study of alignment between the global action plan and national action plans Louise Munkholm & Olivier Rubin, Globalization and Health volume ۱٦, Article number: ۱۰۹ (۲۰۲۰)