به نام خدا

Bacteriology Lab 1

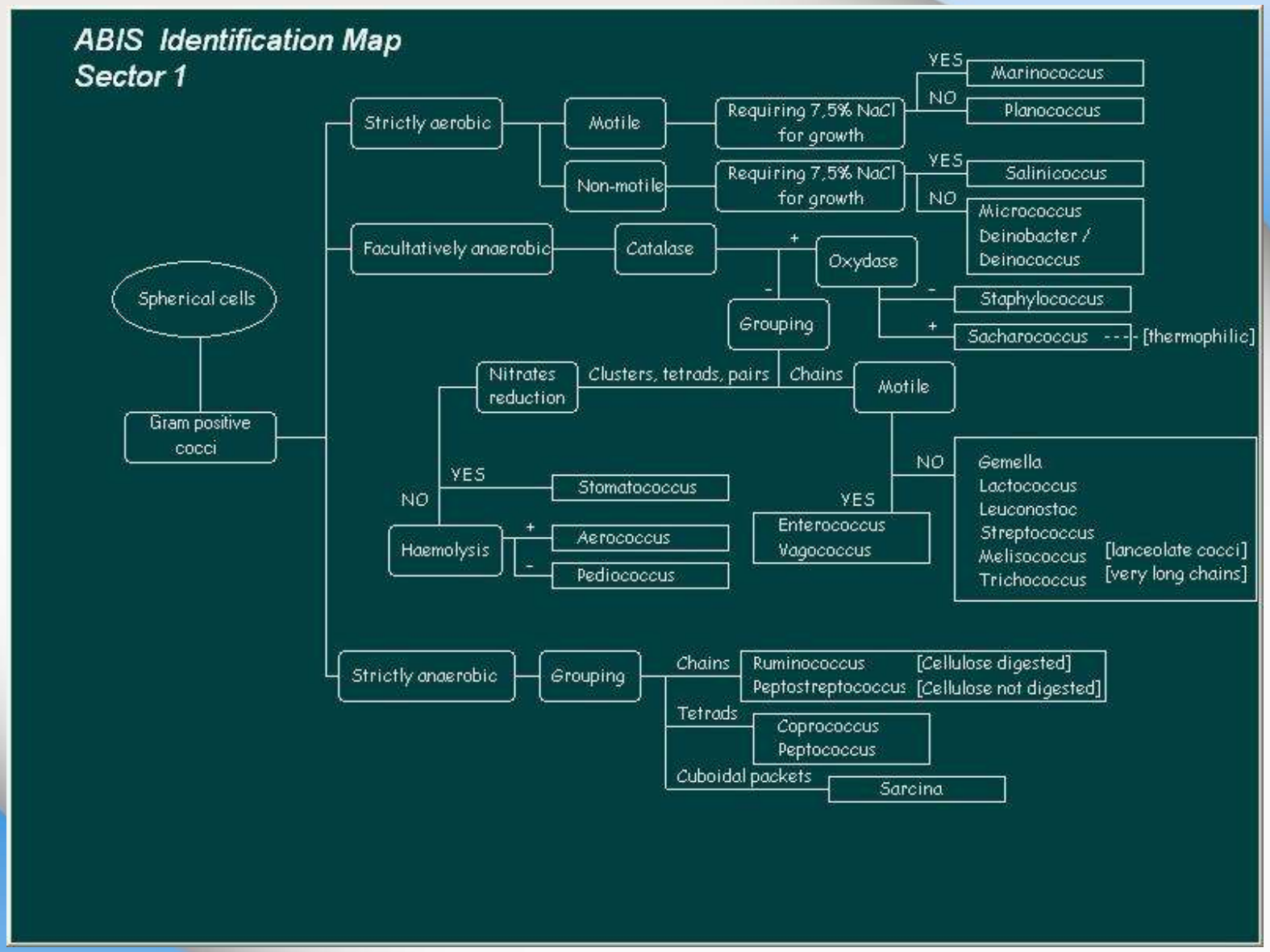
By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

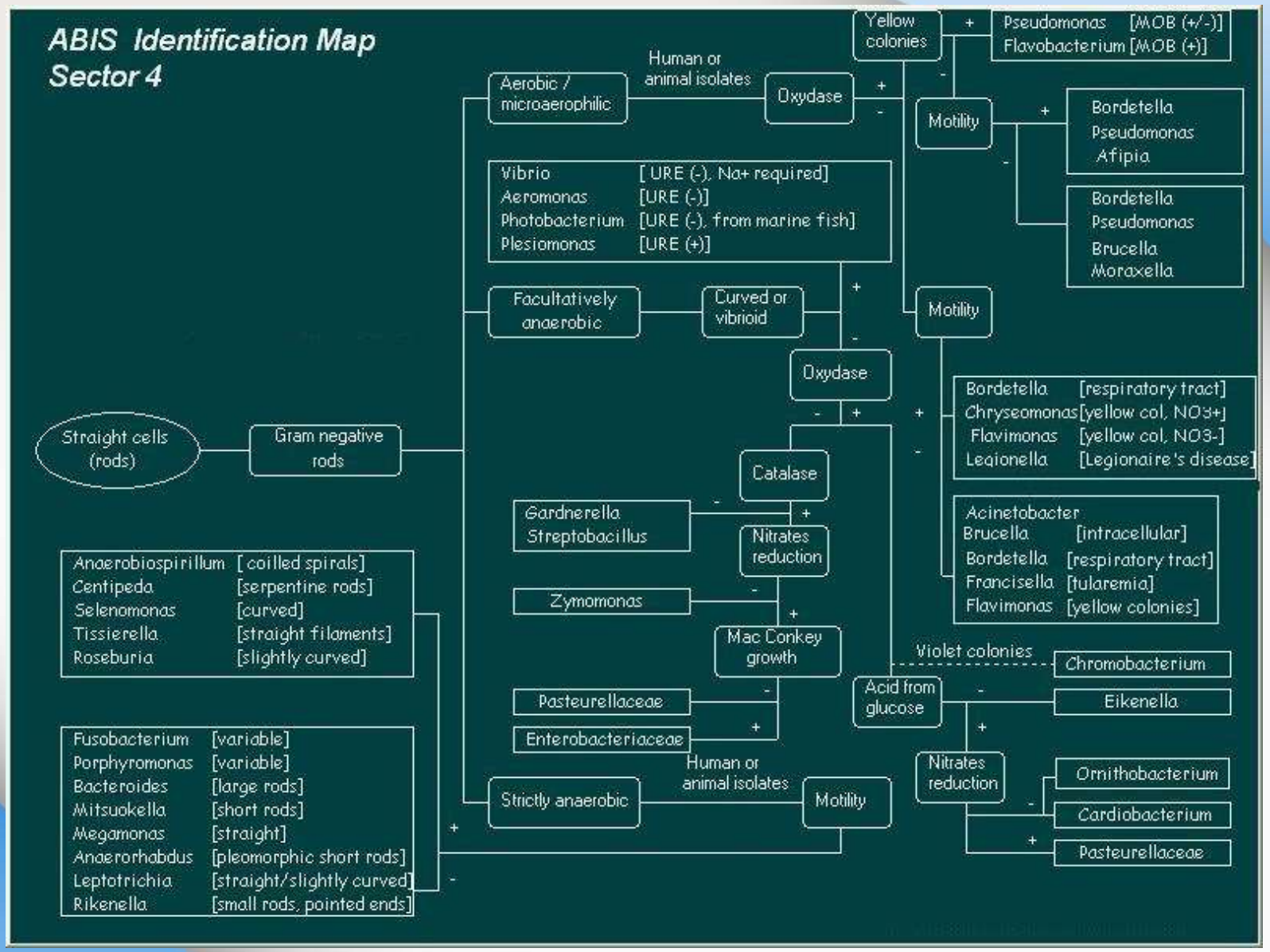
fppt.com

شناسایی و تعیین هویت

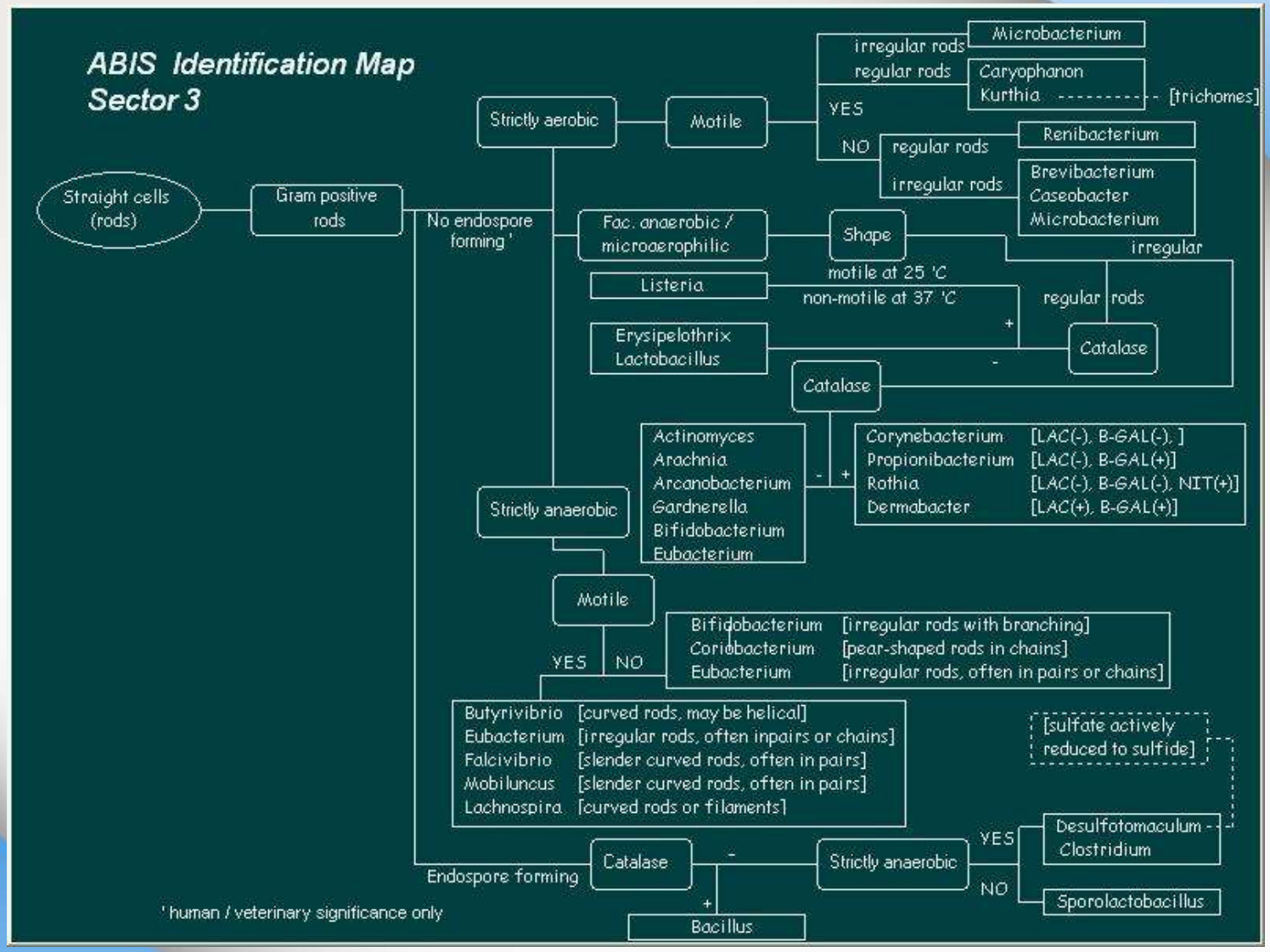
fppt.com


ABIS Identification Map
Sector 1
Spherical cells
Gram positive cocci
Strictly aerobic
Motile
Requiring 7,5% NaCl for growth
YES
Marinococcus
NO
Planococcus
Non-motile
Requiring 7,5% NaCl for growth
YES
Salinicoccus
NO
Micrococcus
Deinobacter / Deinococcus
Facultatively anaerobic
Catalase
+
Oxydase
-
Staphylococcus
+
Sacharococcus
[thermophilic]
-
Grouping
Nitrates reduction
Clusters, tetrads, pairs
Chains
Motile
NO
Gemella
Lactococcus
Leuconostoc
Streptococcus
Melisococcus [lanceolate cocci]
Trichococcus [very long chains]
YES
Enterococcus
Vagococcus
YES
Stomatococcus
NO
Haemolysis
+
Aerococcus
-
Pediococcus
Strictly anaerobic
Grouping
Chains
Ruminococcus [Cellulose digested]
Peptostreptococcus [Cellulose not digested]
Tetrads
Coprococcus
Peptococcus
Cuboidal packets
Sarcina

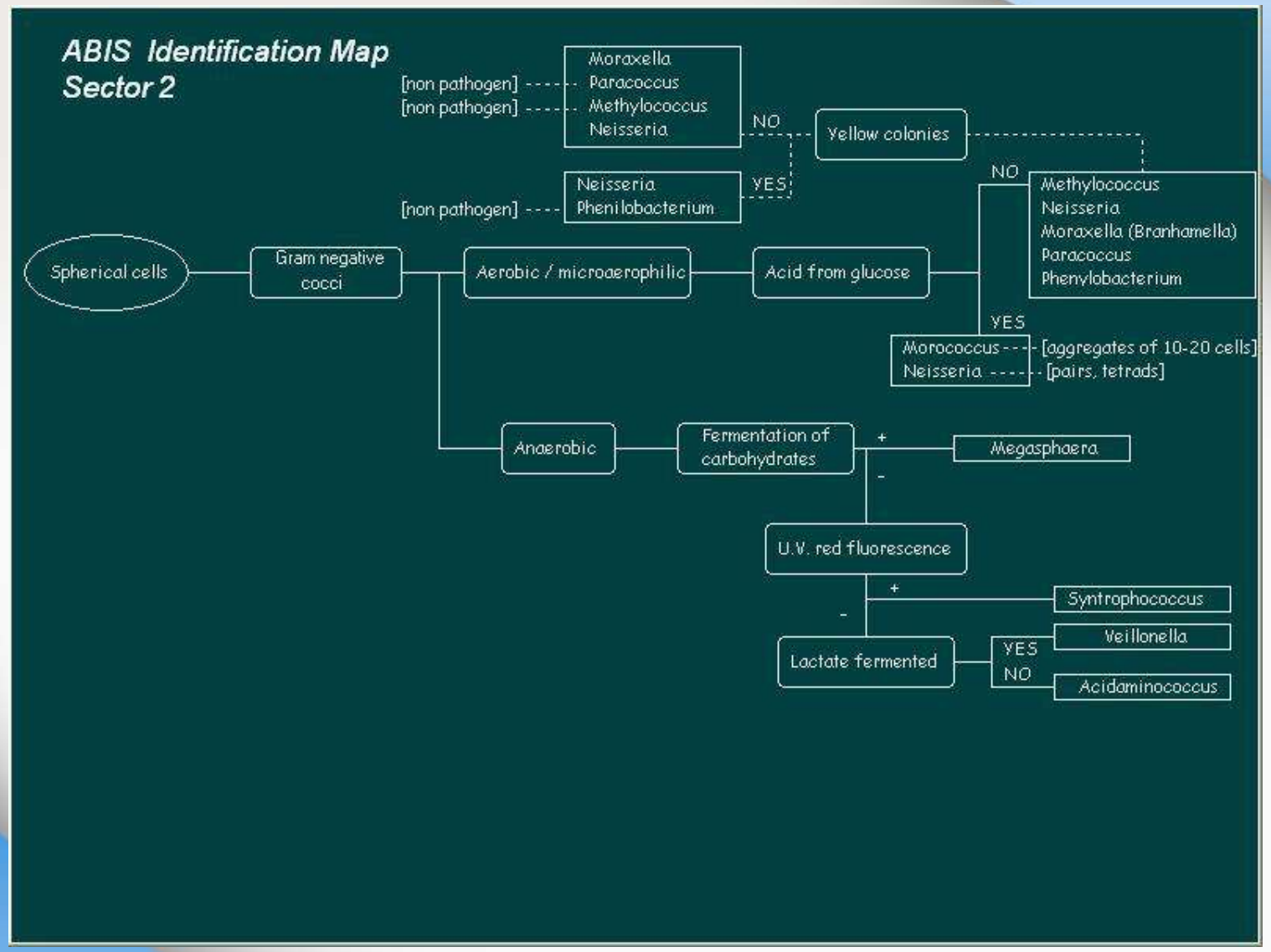
fppt.com


ABIS Identification Map
Sector 4
Straight cells (rods)
Gram negative rods
Aerobic / microaerophilic
Human or animal isolates
Oxydase
Facultatively anaerobic
Curved or vibrioid
Oxydase
Catalase
Gardnerella
Streptobacillus
Nitrates reduction
Zymomonas
Mac Conkey growth
Pasteurellaceae
Enterobacteriaceae
Strictly anaerobic
Human or animal isolates
Motility
Yellow colonies
Pseudomonas [MOB (+/-)]
Flavobacterium [MOB (+)]
Motility
Bordetella
Pseudomonas
Afipia
Bordetella
Pseudomonas
Brucella
Moraxella
Motility
Bordetella [respiratory tract]
Chryseomonas [yellow col, NO3+]
Flavimonas [yellow col, NO3-]
Legionella [Legionaire's disease]
Acinetobacter
Brucella [intracellular]
Bordetella [respiratory tract]
Francisella [tularemia]
Flavimonas [yellow colonies]
Violet colonies
Chromobacterium
Acid from glucose
Eikenella
Nitrates reduction
Ornithobacterium
Cardiobacterium
Pasteurellaceae
Vibrio [URE (-), Na+ required]
Aeromonas [URE (-)]
Photobacterium [URE (-), from marine fish]
Plesiomonas [URE (+)]
Anaerobiospirillum [coilled spirals]
Centipeda [serpentine rods]
Selenomonas [curved]
Tissierella [straight filaments]
Roseburia [slightly curved]
Fusobacterium [variable]
Porphyromonas [variable]
Bacteroides [large rods]
Mitsuokella [short rods]
Megamonas [straight]
Anaerorhabdus [pleomorphic short rods]
Leptotrichia [straight/slightly curved]
Rikenella [small rods, pointed ends]

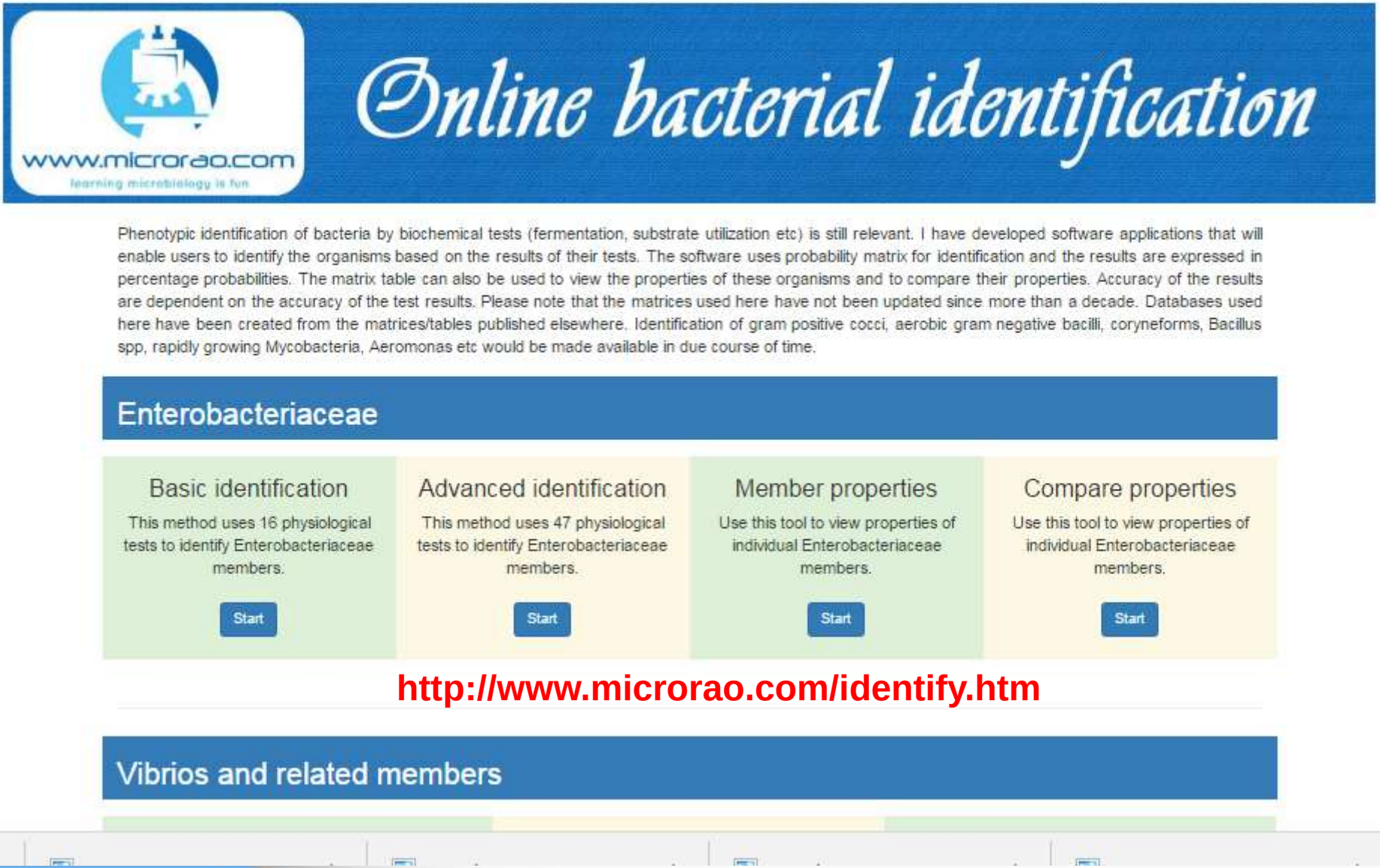
fppt.com


ABIS Identification Map
Sector 3
Straight cells (rods)
Gram positive rods
No endospore forming '
Strictly aerobic
Motile
YES
irregular rods
Microbacterium
regular rods
Caryophanon
Kurthia
[trichomes]
NO
regular rods
Renibacterium
irregular rods
Brevibacterium
Caseobacter
Microbacterium
Fac. anaerobic / microaerophilic
Shape
irregular
Listeria
motile at 25 'C
non-motile at 37 'C
regular rods
+
Erysipelothrix
Lactobacillus
Catalase
-
Catalase
Actinomyces
Arachnia
Arcanobacterium
Gardnerella
Bifidobacterium
Eubacterium
-
+
Corynebacterium [LAC(-), B-GAL(-),]
Propionibacterium [LAC(-), B-GAL(+)]
Rothia [LAC(-), B-GAL(-), NIT(+)]
Dermabacter [LAC(+), B-GAL(+)]
Strictly anaerobic
Motile
YES
NO
Bifidobacterium [irregular rods with branching]
Coriobacterium [pear-shaped rods in chains]
Eubacterium [irregular rods, often in pairs or chains]
Butyrivibrio [curved rods, may be helical]
Eubacterium [irregular rods, often inpairs or chains]
Falcivibrio [slender curved rods, often in pairs]
Mobiluncus [slender curved rods, often in pairs]
Lachnospira [curved rods or filaments]
[sulfate actively reduced to sulfide]
Endospore forming
Catalase
-
+
Bacillus
Strictly anaerobic
YES
NO
Desulfotomaculum - Clostridium
Sporolactobacillus
' human / veterinary significance only

fppt.com


ABIS Identification Map
Sector 2
[non pathogen]
[non pathogen]
Moraxella
Paracoccus
Methylococcus
Neisseria
NO
Yellow colonies
YES
Neisseria
Phenilobacterium
[non pathogen]
NO
Methylococcus
Neisseria
Moraxella (Branhamella)
Paracoccus
Phenylobacterium
Spherical cells
Gram negative cocci
Aerobic / microaerophilic
Acid from glucose
YES
Morococcus
Neisseria
[aggregates of 10-20 cells]
[pairs, tetrads]
Anaerobic
Fermentation of carbohydrates
+
Megasphaera
-
U.V. red fluorescence
+
Syntrophococcus
-
Veillonella
Lactate fermented
YES
NO
Acidaminococcus

fppt.com


www.microrao.com
learning microbiology is fun
Online bacterial identification
Phenotypic identification of bacteria by biochemical tests (fermentation, substrate utilization etc) is still relevant. I have developed software applications that will enable users to identify the organisms based on the results of their tests. The software uses probability matrix for identification and the results are expressed in percentage probabilities. The matrix table can also be used to view the properties of these organisms and to compare their properties. Accuracy of the results are dependent on the accuracy of the test results. Please note that the matrices used here have not been updated since more than a decade. Databases used here have been created from the matrices/tables published elsewhere. Identification of gram positive cocci, aerobic gram negative bacilli, coryneforms, Bacillus spp, rapidly growing Mycobacteria, Aeromonas etc would be made available in due course of time.
Enterobacteriaceae
Basic identification
This method uses 16 physiological tests to identify Enterobacteriaceae members.
Start
Advanced identification
This method uses 47 physiological tests to identify Enterobacteriaceae members.
Start
Member properties
Use this tool to view properties of individual Enterobacteriaceae members.
Start
Compare properties
Use this tool to view properties of individual Enterobacteriaceae members.
Start
http://www.microrao.com/identify.htm
Vibrios and related members

fppt.com

Arginine dihydrolase test	Positive	Negative	Unknown
Motility test	✓ Positive	Negative	Unknown
Gas from glucose	✓ Positive	Negative	Unknown
Lactose fermentation test	Positive	✓ Negative	Unknown
Sucrose fermentation test	✓ Positive	Negative	Unknown
Mannitol fermentation test	Positive	✓ Negative	Unknown
ONPG test	✓ Positive	Negative	Unknown

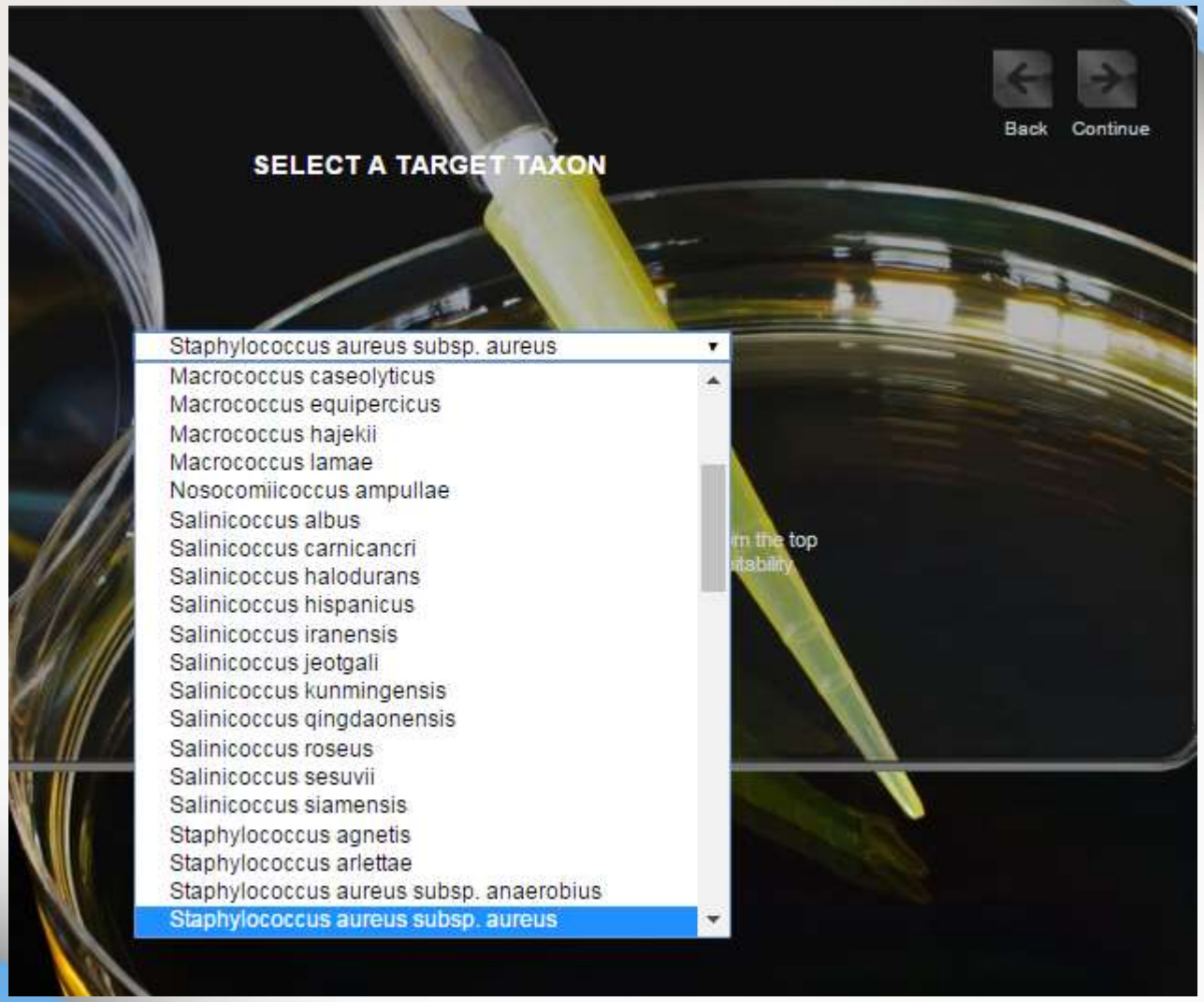
Identify now | Reset results | Back to the identification page

Likelihood of this organism is as follows:
Klebsiella oxytoca : 99.39%

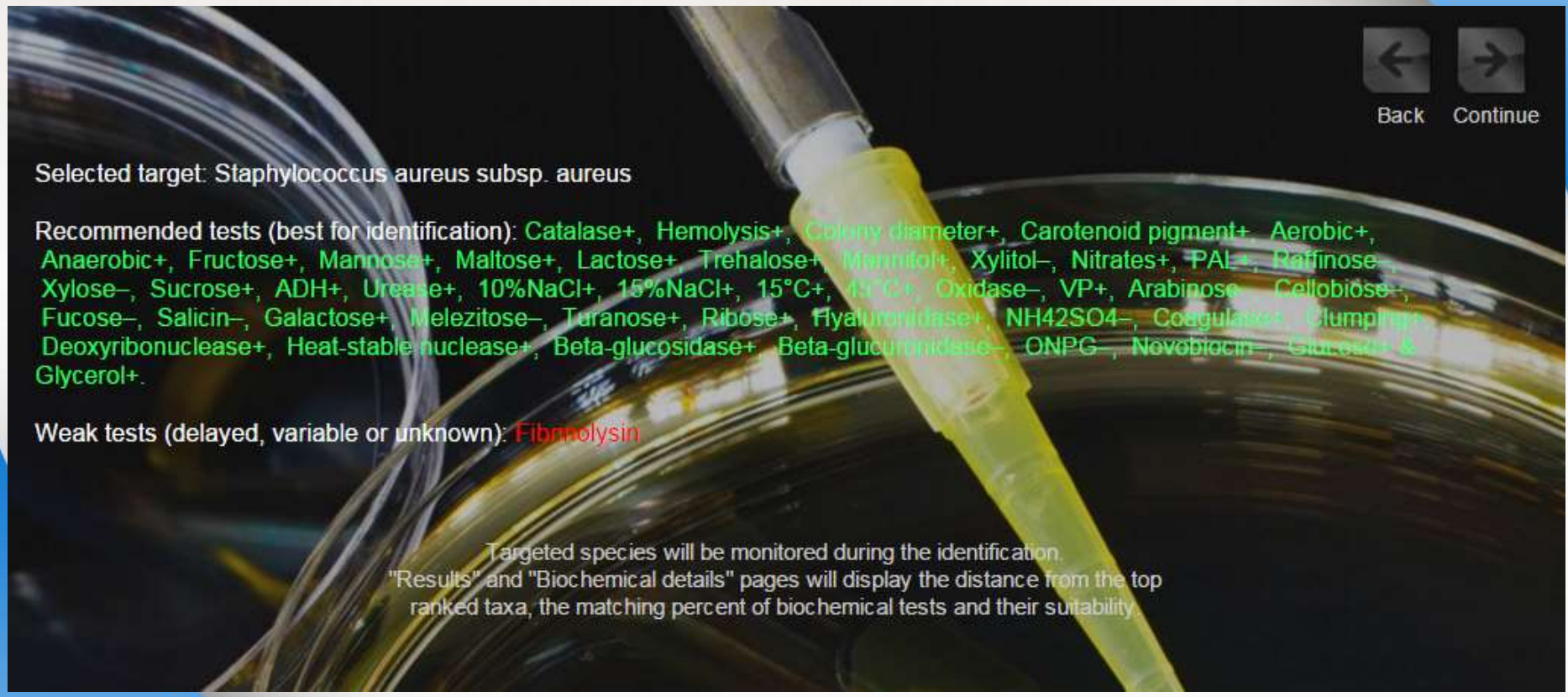
fppt.com

ABIS online

fppt.com


Back
Continue
SELECT A TARGET TAXON
Staphylococcus aureus subsp. aureus
Macrococcus caseolyticus
Macrococcus equipercicus
Macrococcus hajekii
Macrococcus lamae
Nosocomiicoccus ampullae
Salinicoccus albus
Salinicoccus carnicancri
Salinicoccus halodurans
Salinicoccus hispanicus
Salinicoccus iranensis
Salinicoccus jeotgali
Salinicoccus kunmingensis
Salinicoccus qingdaonensis
Salinicoccus roseus
Salinicoccus sesuvii
Salinicoccus siamensis
Staphylococcus agnetis
Staphylococcus arlettae
Staphylococcus aureus subsp. anaerobius
Staphylococcus aureus subsp. aureus

fppt.com



http://tgwphp.tegrat_fatS_airetcab/ten.۱۹۱۶

fppt.com

	Positive	Negative	Unknown
Diameter > 5 mm in 48 hours	○	○	◉
Carotenoid pigment production	○	○	◉
Aerobic growth	◉	○	○
Anaerobic growth	○	○	◉
Growth at 15 °C	○	○	◉
Growth at 45 °C	○	○	◉
Hemolysis	○	◉	○
Growth on 10% NaCl agar	○	○	◉
Growth on 15% NaCl agar	○	○	◉
Nitrates reduction	○	○	◉
Acetoin production (VP)	○	○	◉
Alkaline phosphatase (PAL)	◉	○	○
Arginine dihydrolase (ADH)	○	○	◉
Urease	○	○	◉
Hyaluronidase	○	○	◉
Growth on $(NH_4)_2SO_4$	○	○	◉
Coagulase-rabbit plasma	◉	○	○
Clumping factor	○	○	◉
Fibrinolysin	○	○	◉
Deoxyribonuclease agar	○	○	◉
Heat-stable nuclease	○	○	◉
Beta-glucosidase (esculinase)	○	○	◉
Beta-glucuronidase	◉	○	○
Beta-galactosidase (ONPG)	◉	○	○

	Positive	Negative	Unknown
Catalase	○	○	◉
Oxidase	○	○	◉
Novobiocin resistance (1.6 µg)	○	○	◉
Acid production from			
Arabinose	○	○	◉
Cellobiose	○	○	◉
Fructose	○	○	◉
Fucose	○	○	◉
Galactose	○	○	◉
Glucose	○	○	◉
Glycerol	◉	○	○
Lactose	○	○	◉
Maltose	○	○	◉
Mannitol	○	○	◉
Mannose	○	○	◉
Melezitose	○	○	◉
Raffinose	○	○	◉
Ribose	○	○	◉
Salicin	○	○	◉
Sucrose (Sacharose)	○	○	◉
Trehalose	○	○	◉
Turanose	○	◉	◉
Xylitol	○	○	◉
Xylose	○	○	◉

Automatic mode ▾

fppt.com

آزمایشگاه نخست

استافیلوکوکوس

fppt.com

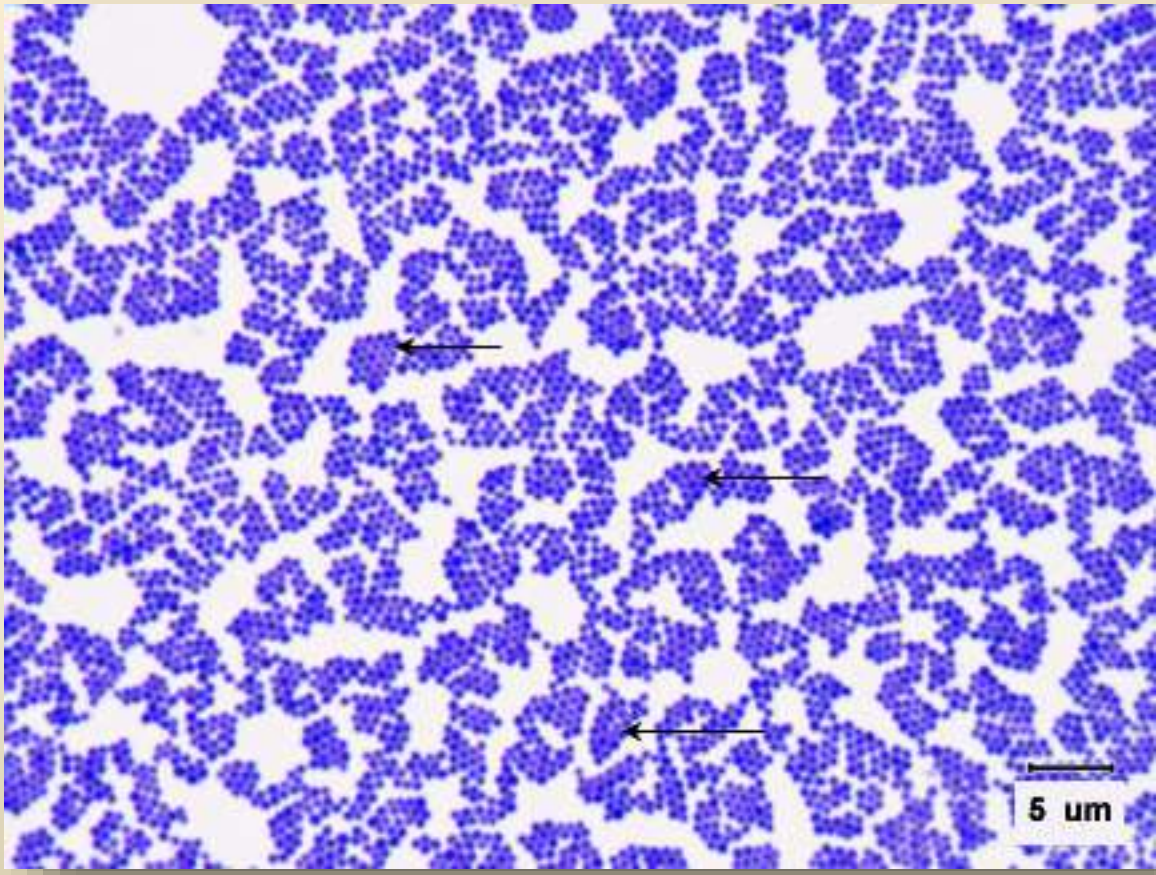
- Family: **Micrococcaceae**
- Genus:
  - Staphylococcus
    - Coagulase positive: *S. aureus*
    - Coagulase negative: *S. epidermidis, S. saprophyticus, S. haemolyticus*
  - Micrococcus

استافیلوکوک ها

- استافیلوکوک‌ها دارای حداقل ۴۰ گونه می‌باشند.
- استافیلوکوک‌ها، کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای شکل هستند که آنزیم کاتالاز را تولید می‌کنند. از این راه می‌توان استافیلوکوک‌ها را از استرپتوکوک‌ها و انتروکوک‌ها متمایز ساخت.
- گونه‌های استافیلوکوک، بی هوازی اختیاری هستند یعنی هم در شرایط هوازی و هم شرایط بی هوازی می‌توانند رشد کنند.
- تمام گونه‌ها در حضور نمک‌های صفراوی رشد می‌کنند و همگی کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی می‌باشند.
- بدون حرکت، بدون کپسول و بدون اسپور هستند.
- آن‌ها ممکن است در محلول نمکی ٪۶/۵ نیز رشد کنند. تخمیرکننده گلوگز هستند.
- استافیلوکوک‌ها به باسیتراسین (دیسک ۰/۰۴ واحد) مقاوم اما به فورازولیدون (دیسک ۱۰۰ میکروگرم) حساس هستند.

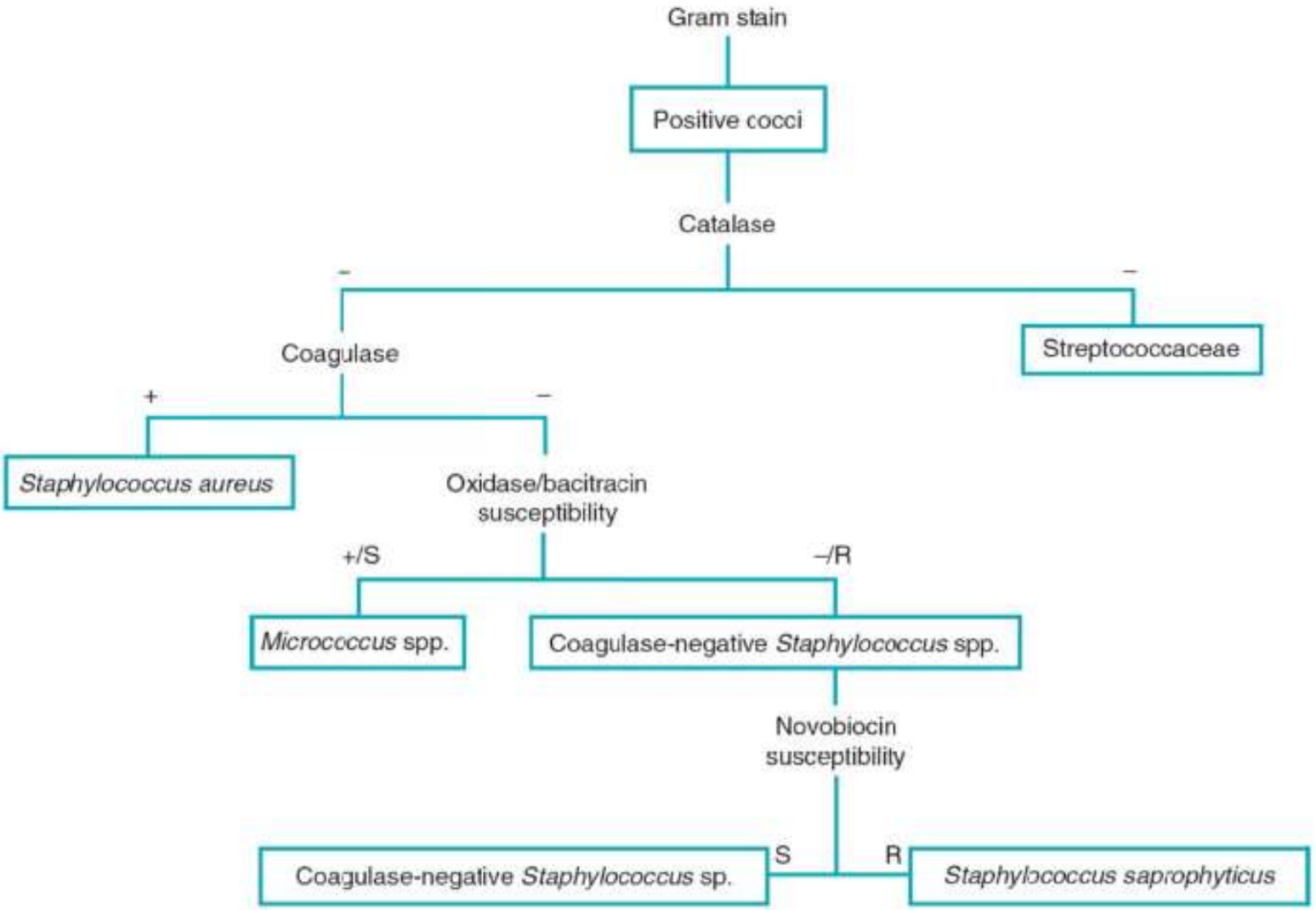
Microscopic Examination

- Gram reaction
  - Gram-positive cocci
- Cell arrangement
  - Pairs and clusters
- Presence/Absence of PMNs
  - Numerous polymorphonuclear cells (PMNs)



جنس استافیلوکوک جزء خانواده میکروکوکاسیه بوده (شامل جنس های پلانوکوک، استوماتوکوک و میکروکوک) است. میکروکوک ها باکتری های گرم مثبت و کاتالاز مثبت هستند که بر اساس خصوصیات ذکر شده در جدول ۴-۱ از گونه های جنس استافیلوکوک متمایز می شوند

جنس استافیلوکوکوس به بیش از ۴۵ گونه تقسیم می شود که استافیلوکوکوس اورئوس(*Staphylococcus aureus*) یا استافیلوکوک طلایی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (*S. epidermidis*) و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (*S. saprophyticus*) مهمترین گونه های بیماریزا در انسان محسوب می شوند. قدرت بیماریزایی استافیلوکوک طلایی از انواع دیگر بیشتر است.



شکل ۴-۱: دیاگرام تشخیص باکتری های کوکسی گرم مثبت در نمونه های بالینی

جدول ۴-۱: تمایز جنس استافیلوکوکوس از میکروکوکوس

آزمایش	استافیلوکوک ها	استرپتوکوک ها
اکسیداز اصلاح شده	−	+
تولید اسید از گلوکز در شرایط بی هوازی	+	− ‡
رشد بر روی محیط Furoxone- Tween 80-oil red agar	−	+
تولید اسید از گلیسرول در حضور اریترومایسین	+	−
مقاومت به باسی تراسین (0.04 U)	مقاوم†	حساس
مقاومت به لیزوزوم (دیسک 50-µg)	مقاوم	حساس
تست لیزواستافین	حساس †	مقاوم

‡ گونه های *Micrococcus krisinae* و *Micrococcus varians* مثبت هستند

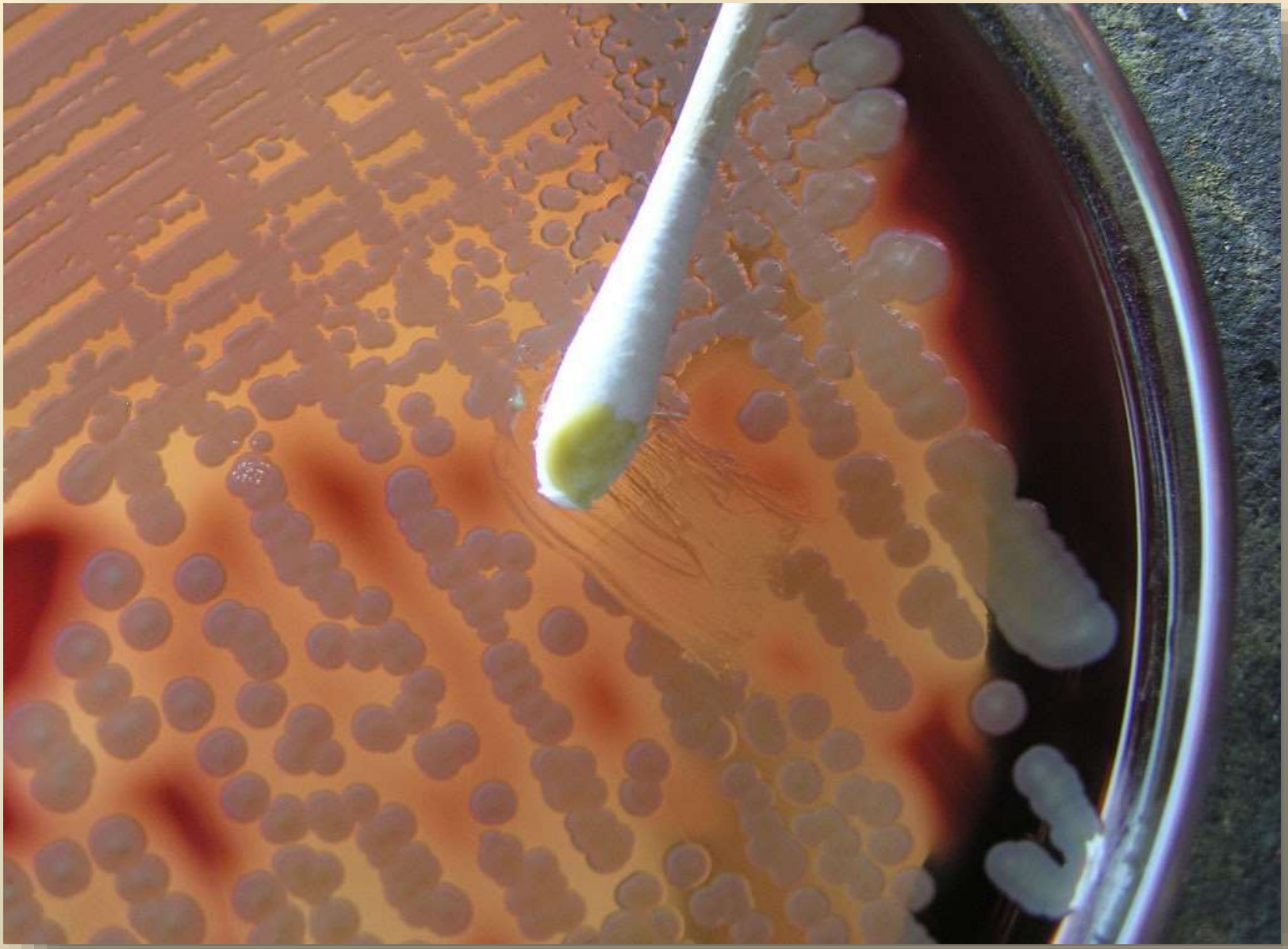
† برخی از سویه های واکنش عکس نشان می دهند.

جدول ۴-۲: تشخیص افتراقی گونه های مهم استافیلوکوکوس						
باکتری	پیگمان	کوآگولاز	نوکلئاز مقاوم به حرارت (DNase)	اوره آز	مقاومت به نووبیوسین	مقاومت به پلی میکسین B
استافیلوکوکوس آرئوس	+	+	+	متغیر	حساس	حساس
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	-	-	-	+	حساس	مقاوم
استافیلوکوکوس ساپروفیتکوس	متغیر	-	-	+	مقاوم	حساس

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

Non-hemolytic Staphylococcus species: *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus saprophyticus: non-hemolytic, bright white, creamy colonies



Strains of *Staphylococcus aureus* produce a golden yellow pigment

Strains of *Staphylococcus aureus* not a golden yellow pigment producer

کاتالاز (لامی)

اساس تست: تشخیص حضور آنزیم کاتالاز

هدف تست: افتراق جنس استافیلوکوکوس از جنس استرپتوکوکوس

دستور کار:

با سوآپ

الف- چند قطره از محلول آب اکسیژنه۳٪ به کلنی باکتری اضافه می شود.

ب) تشکیل سریع حباب های گاز (O_2) مورد بررسی قرار می گیرد.

Catalase +ve

تفسیر تست

مشاهده حباب گاز بیانگر حضور آنزیم کاتالاز است

کنترل مثبت: *Staphylococcus aureus* ATCC12600

کنترل منفی: *Streptococcus pyogenes* ATCC12344

کشت در مانیتول سالت آگار (شاپمن)

اساس تست: توانایی رشد ارگانیسم در حضور ۷/۵٪ نمک و استفاده (تخمیر) از مانیتول

هدف تست: جدا سازی و شناسایی جنس استافیلوکوکوس از نمونه های مخلوط با فلور میکربی

دستور کار:

الف- با آنس مقداری از کلنی باکتری مجهول را برداشته و به صورت خطوط زیگزاگ بر روی محیط شاپمن کشت دهید

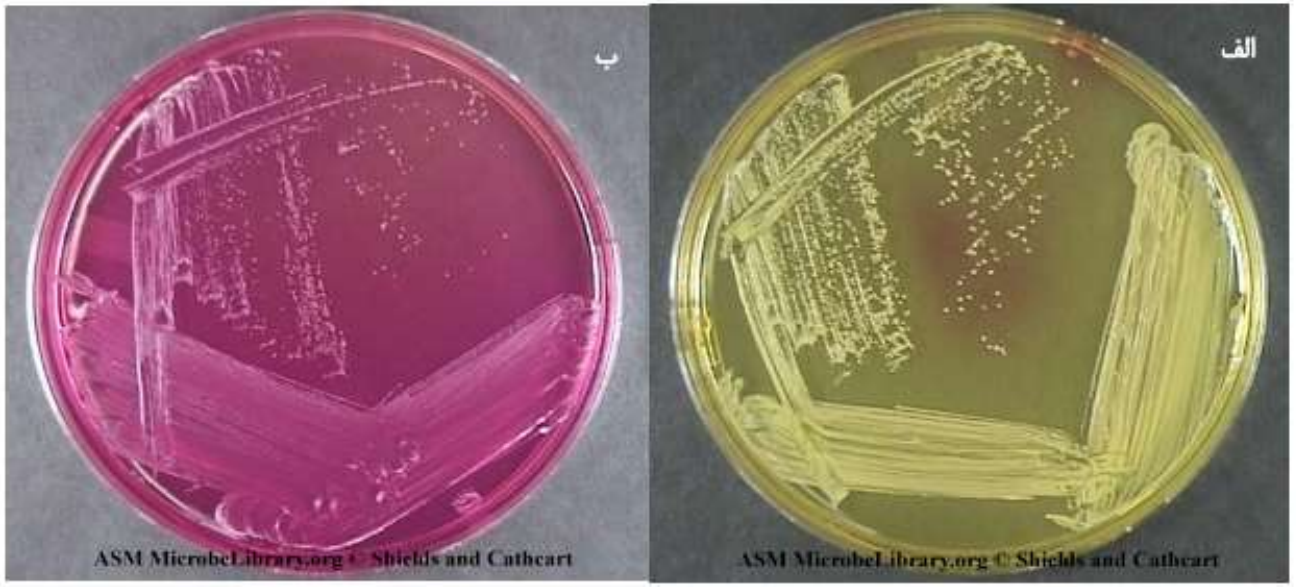
ب- محیط شاپمن را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ ° C قرار دهید و محیط را جهت رشد باکتری و همچنین تغییر رنگ از قرمز به زرد بررسی نمایید

تفسیر تست

استافیلوکوکوس اورئوس از مانیتول بعنوان تنها منبع کربن استفاده کرده محیط را اسیدی نموده و رنـگ آن را زرد می نماید. سایر استافیلوکوک ها (استافیلوکوک های کواگولاز منفی) در محیط تغییر رنگ ایجاد نمی نمایند (شکل ۴-۶).

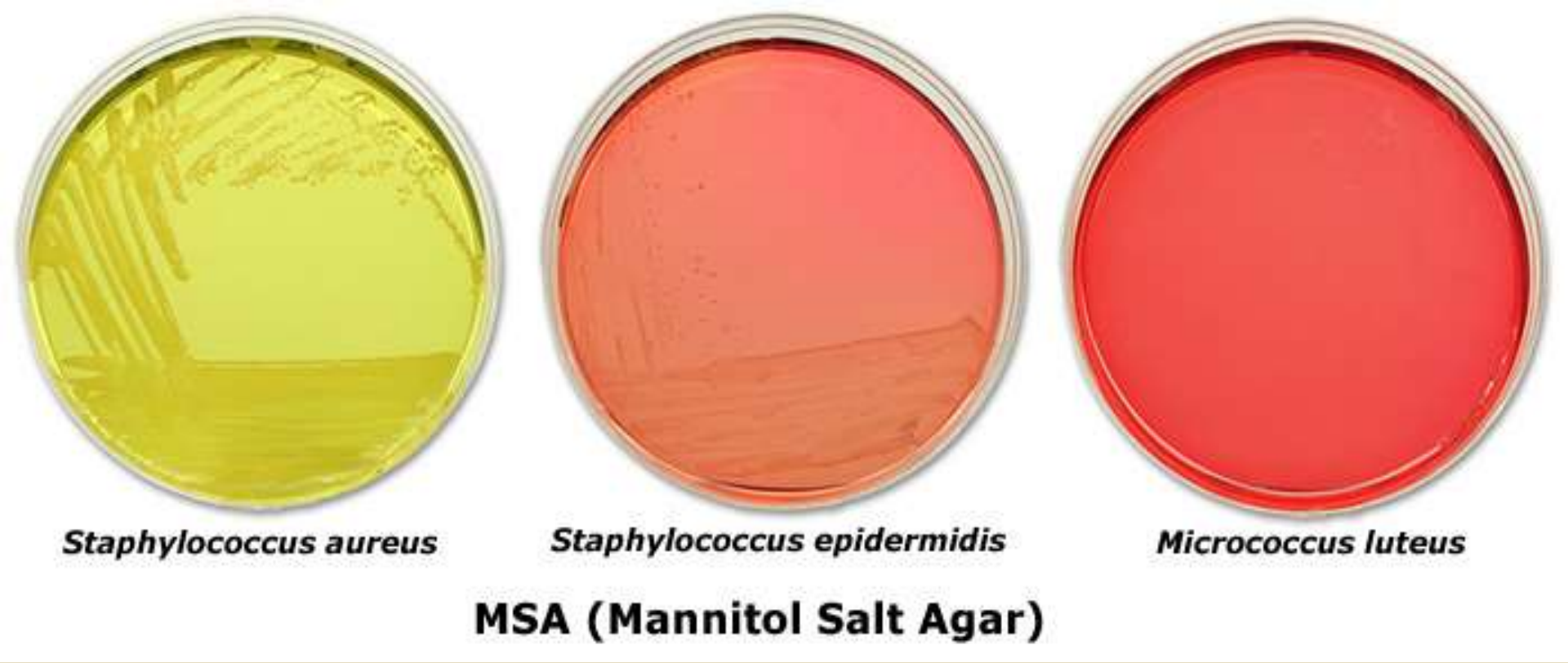
کنترل مثبت: (شکل ۴-۶ الف) *Staphylococcus aureus* ATCC12600

کنترل منفی: (شکل ۴-۶ ب) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990



شکل ۴-۶. رشد استافیلوکوک ها بر روی محیط مانیتول سالت آگار. الف) استافیلوکوکوس آرئوس ب) استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس.

Mannitol Salt agar



لیپاز

با لوپ استریل مقداری از باکتری مجهول را برداشته و در محیط حاوی زرده‌ی تخم مرغ کشت می‌دهیم. اگر اطراف کلنی شفاف شد، یعنی لیپیدهای موجود در زده تخم‌مرغ تجزیه شده و باکتری آنزیم لیپاز دارد (لیپاز +) ولی اگر محیط کدر بماند، لیپاز منفی است.

بعضي فرمولاسيون ها توصيه مي كنند 20CC زرده تخم مرغ استريل به محيط اضافه شود، استافيلوكوك هاي كواگولاز مثبت همزمان ليپاز نيز دارند بنابراين رسوب كدري در اطراف كلني ها ظاهر خواهد شد. استافيلو كوك هايي كه كواگولاز توليد نمي كنند ليپاز نداشته و هاله ايجاد نمي كنند.

باکتری لیپاز مثبت و تخمیر کننده ی مانیتول	کلنی های زرد رنگ همراه با هاله های زرد
باکتری لیپاز منفی و عدم تخمیر مانیتول	کلنی های قرمز رنگ و یا بیرنگ همراه با محیط کشت قرمز رنگ

تست DNase

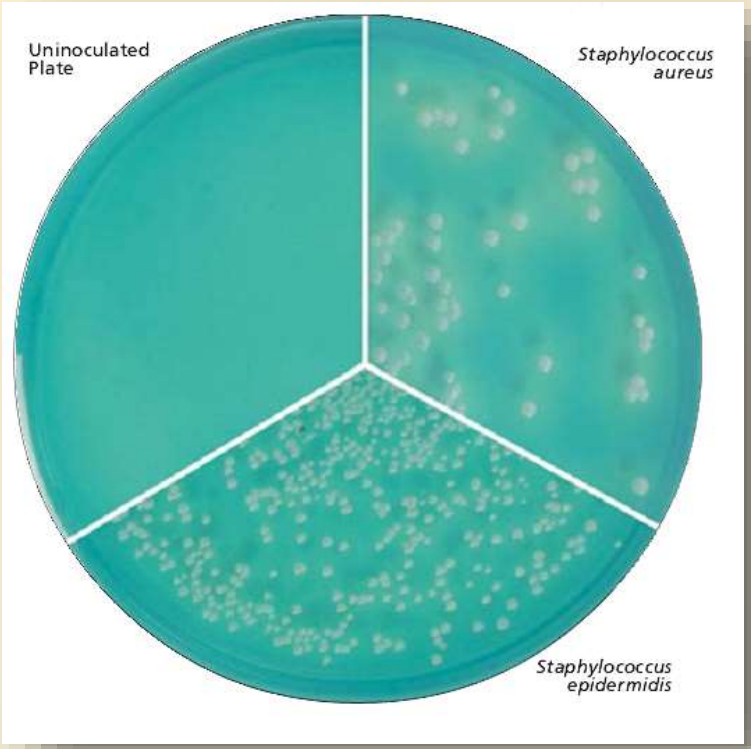
اساس تست: تعیین توانایی استافیلوکوکوس جهت تولید آنزیم داکسی ریبونوکلئاز (DNase) که باعث دپلی مریزاسیون DNA می گردد.

هدف تست: بعنوان یک تست کمکی جهت تائید تشخیص سویه های استافیلوکوکوس اورئوس که آنزیم کواگولاز قابل تشخیص ندارند، به کار می رود (شکل۴-۴)

Staphylococcus epidermidis **Growing on DNase Agar**

Note there is no breakdown of the DNA in the agar. After adding the **1N HCl**, the entire plate turned cloudy as the DNA precipitated out of solution. There is no clear zone around the bacterial growth.

DNase Test Agar with Methyl Green



Methyl green forms a complex with intact (polymerized) DNA to form the green color of the medium. DNase activity depolymerizes the DNA, breaking down the methyl green-DNA complex, which results in the formation of colorless zones around colonies of the test organism. A negative test is indicated by the absence of a colorless zone around the colonies.

DNase Test Agar with Toluidine Blue

Toluidine blue forms a complex with intact (polymerized) DNA. In the intact DNA complex, the toluidine blue has the normal blue color. Dnase activity depolymerizes the DNA, breaking down the dye-DNA complex. In the presence of nucleotides produced from the DNase depolymerization, the dye takes on its metachromatic color, forming pink to red zones around bacterial growth. A negative test is indicated when the medium remains blue.

تست DNase

دستور کار:

الف- با لوپ مقداری از کلنی کشت تازه باکتری را به صورت نقطه ای در داخل پلیت حاوی DNase Agar کشت داده می شود.

ب- پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ ° C قرار داده می شود.

ج- مقداری محلول اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال بر روی باکتری کشت داده شده اضافه می شود.

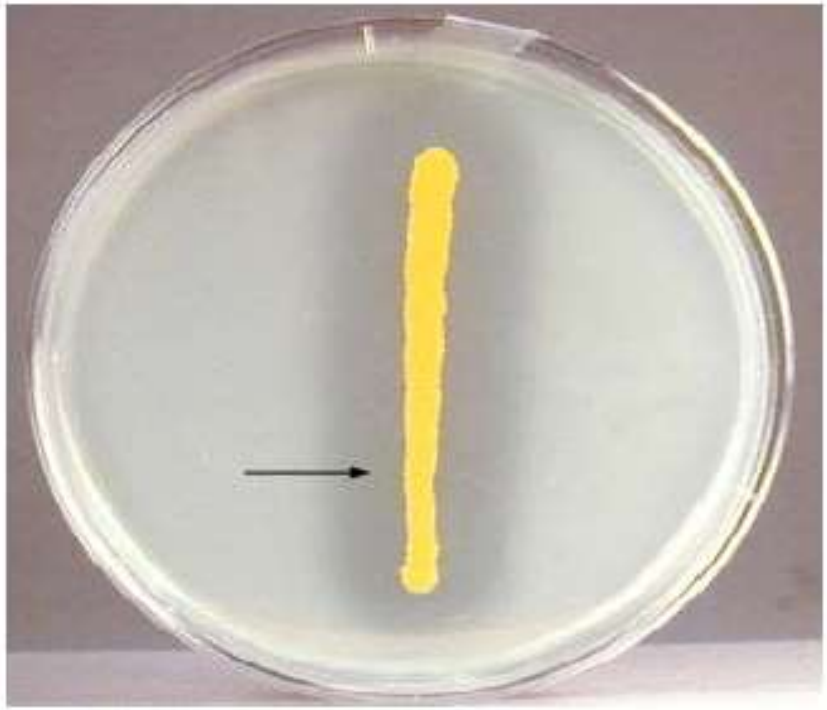
د- هاله شفاف در اطراف منطقهٔ رشد مورد بررسی قرار می گیرد.

تفسیر تست

هاله ای شفاف در اطراف منطقهٔ رشد بیانگر حضور آنزیم DNase می باشد. (اولیگونوکلئوتیدهای آزاد شده در نتیجه فعالیت آنزیم دی ان آز، در اسید کلریدریک محلول می باشند).

کنترل مثبت: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

کنترل منفی: *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228



گزیلوز و مانوز

- مراحل:

۱) در دو محیط کشت حاوی قند گزیلوز و مانوز باکتری را توسط لوپ حل کنید.

۲) قرار دادن در انکوباتور و بررسی نتایج

آزمایش ۷ (مصرف مانورmax و گزیلوز xly): از باکتری یک لوپ برداشته و در محیط فنول رد براث بیس (محیط پایه بدون قند+ معرف PH ۱٪ فنون رد + قند مورد نظر مانوز یا گزیلوز) کشت می‌دهیم.

اگر باکتری یکی از این قندها یا هر دو را مصرف کند PH محیط کاهش یافته و رنگ آن زرد می‌شود در غیر این صورت قرمز باقی می‌ماند.

آمیلاز (هیدرولیز نشاسته)

- مراحل:

۱) باکتری را توسط لوپ در محیط STARCH AGAR کشت خطی میدهیم

۲) قرار دادن در انکوباتور و بررسی نتایج بعد از افزودن لوگول

کواگولاز

کاربرد: تست کواگولاز[1] معمولاً برای تمایز استافیلوکوکوس اورئوس از سایر کوکسی‌های گرم مثبت به کار گرفته می‌شود.

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن فرصت‌طلب است که به شدت مقاوم به پاسخ‌های ایمنی و عوامل آنتی‌باکتریال می‌باشد. یکی از دلایل مقاومت این باکتری، تولید آنزیم کواگولاز است. کواگولاز با همکاری ترکیبات طبیعی پلاسما، سد فیبرینی محافظتی را اطراف سلول‌های منفرد باکتری یا تجمع سلولی ایجاد می‌کند تا آن‌ها را از فاگوسیتوز یا سایر حملات محافظت کند.

آنزیم‌های کواگولاز به دو شکل آزاد و باند شده وجود دارند. کواگولاز باند شده که" فاکتور کلامپ"[2] هم نامیده می‌شود، به دیواره سلولی باکتری متصل بوده و مستقیماً با فیبرینوژن موجود در پلاسما واکنش می‌دهد. سپس با رسوب فیبرینوژن، سلول‌ها به شکل توده قابل‌مشاهده باهم مجتمع می‌شوند. کواگولاز آزاد یک آنزیم خارج سلولی (آزاد شده از سلول) می‌باشد که با ترکیبی از پلاسما به نام فاکتور واکنش‌دهنده با کواگولاز (CRF)[3] واکنش می‌دهد. نتیجه این واکنش مشابه تبدیل پروترومبین و فیبرینوژن در مکانیسم طبیعی لخته شدن خون می‌باشد.

دستور کار:

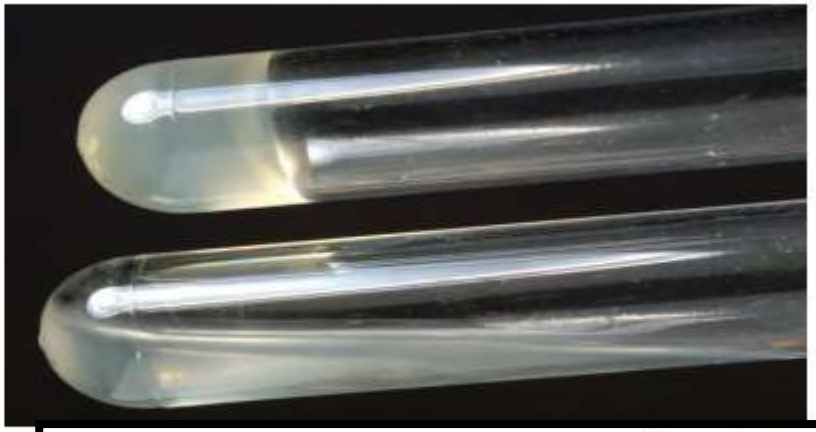
الف-.یک لوپ پر از کلنی باکتری مورد بررسی را برداشته در داخل لوله آزمایش حاوی ۰/۵ سی سی از پلاسمای انسان که به نسبت $\frac{۱}{۵}$ رقیق شده است اضافه نمایید

ج- لوله آزمایش را به آرامی تکان داده به مدت ۴ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ $^{\circ}$ C قرار دهید.

د- هر نیم ساعت لوله را جهت مشاهده لخته بررسی نمایید (هنگام بررسی لوله آزمایش از تکان دادن آن خودداری نمایید)

ه- اگر تا ۴ ساعت لخته مشاهده نشد لوله آزمایش را به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۵ $^{\circ}$ C) قرار دهید.

و- لوله آزمایش را جهت مشاهده لخته بررسی نمایید.



شکل) **تست لوله‌ای کواگولاز**. لوله‌ی کواگولاز حاوی باکتری کواگولاز منفی (-) در پایین و لوله‌ی کواگولاز حاوی باکتری کواگولاز مثبت (+) در بالا قرار دارد. تست لوله‌ای برای تشخیص هر دو آنزیم کواگولاز آزاد و باند شده استفاده می‌شود. کواگولاز مقاومت باکتری‌ها را به فاگوسیتوز و آنتی‌بادی به‌واسطه احاطه کردن باکتری‌های عفونی با لخته افزایش می‌دهد.

استافیلوکوکوس اورئوس حاوی آنزیم کوآگولاز بوده باعث لخته شدن پلاسما می شود (شکل ۴-۲).

کنترل مثبت: *Staphylococcus aureus* ATCC12600

کنترل منفی: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990

هر گروه:

- سه لوله پلاسما استریل خرگوش (۰/۵ میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش به اندازه 12mm × 75 (mm
- پی‌پت‌های استریل ۱ میلی‌لیتر
- سالین استریل (0.9% NaCl)
- اسلایدهای میکروسکوپ (لام)
- کشت‌های شیب‌دار تازه از :
  - ♦ استافیلوکوکوس اورئوس (BSL-2)
  - ♦ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

الف)تست لوله‌ای

۱) سه لوله‌ی کواگولاز را آماده کنید. دو لوله را با نام‌های باکتری‌ها، نام خودتان و تاریخ نام‌گذاری کنید. لوله سوم به عنوان کنترل نام‌گذاری شود.

۲) دو لوله را با دو باکتری مورد آزمایش را تلقیح کنید. محتوی داخل لوله را با چرخش آرام لوله بین دستانتان مخلوط کنید. در لوله‌ی کنترل هیچ تلقیحی انجام نشود.

۳) تمام لوله‌ها را در انکوباتور با دمای ۳۵ ± ۲ °C تا ۲۴ ساعت قرار دهید. به صورت دوره‌ای برای ۴ ساعت اول از نظر انعقاد لوله‌ها چک شوند.

ب) تست اسلایدی (فاکتور کلامپ)

۱) دو لام میکروسکوپی را آماده کنید؛ و آن‌ها را با مارکر به دو قسمت تقسیم کنید و هر بخش را با نام A و B نام‌گذاری کنید.

۲) یک قطره سالین استریل (سرم فیزیولوژی) را روی بخش A و یک قطره پلاسما کواگولاز را روی بخش B هر اسلاید قرار دهید.

۳) مقداری از کلنی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را با لوپ برداشته و به قطرات روی هر بخش از اسلایدها منتقل کنید. مطمئن باشید که کاملاً باکتری‌ها در محلول‌ها معلق و امولسیون شوند. طی ۲ دقیقه آگلوتیناسیون مشاهده می‌شود. تجمع بعد از دو دقیقه به عنوان نتیجه مثبت نمی‌باشد.

۴) مرحله ۳ را برای باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اسلاید دوم تکرار کنید.

۵) نتایج خود را در جدول دفتر نتایج ثبت کنید. برای تفسیر نتایج به شکل و جدول مربوطه رجوع کنید. هر نتیجه منفی را برای تأیید با تست لوله‌ای انجام شده در ۲۴ ساعت مقایسه کنید.

آزمایشگاه دوم

۱) لوله‌ها را ۲۴ ساعت بعد از تلقیح از انکوباتور خارج کرده و از نظر تشکیل لخته بررسی کنید.

۲) نتایج را در دفتر نتایجتان ثبت کرده و با توجه به شکل و جدول مربوطه، نتایج را تفسیر کنید.

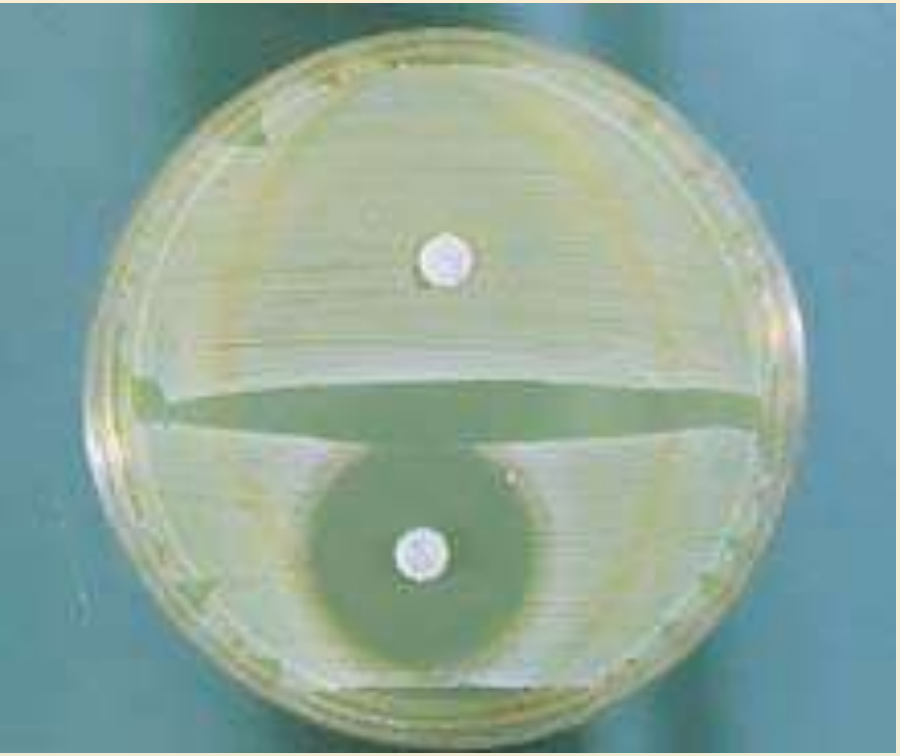
جدول) نتایج تست اسلایدی کواگولاز و تفسیر آن

نتیجه	تفسیر	علامت
تجمع سلول‌ها	انعقاد پلاسما	+
عدم تجمع سلول‌ها	عدم انعقاد در پلاسما	–

جدول) نتایج تست لوله‌ای کواگولاز و تفسیر آن

نتیجه	تفسیر	علامت
محیط جامد	پلاسما منعقد شده است	+
محیط مایع	پلاسما منعقد نشده است	–

آنتی بیوگرام به نوو بیوسین



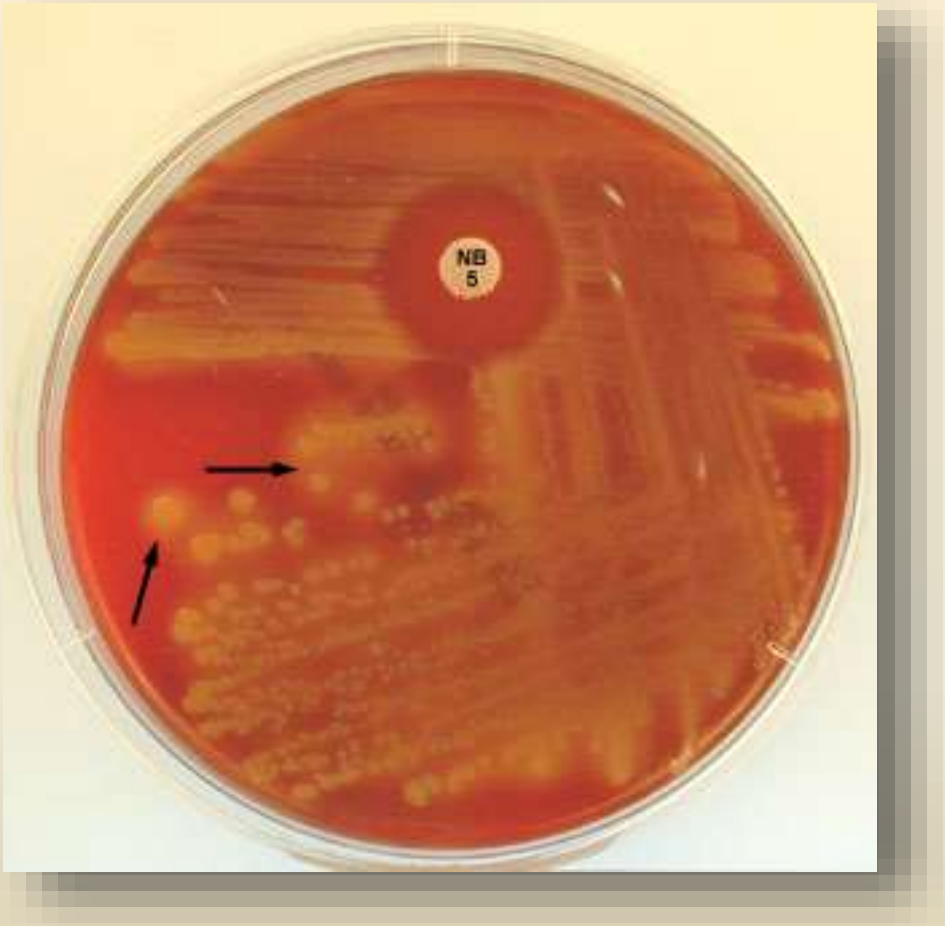
- مراحل:

۱) کشت نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون آگار توسط سواپ

۲) سپس آنتی بیوتیک نوو بیوسین را در وسط محیط قرار داده و در انکوباسیون قرار میدهیم تا نتیجه را بعدا مشاهده کنیم .

- *S. saprophyticus* is resistant (top)
- Other CNS are susceptible

Staphylococcus aureus **Growing on Blood Agar**



Note beta hemolysis (complete lysis of the red blood cells around the colonies; see arrows) on the blood agar and the organism is sensitive to the antibiotic novobiocin.

Staphylococcus epidermidis **Growing on Blood Agar**

Note there is no hemolysis (gamma reaction) on the blood agar and the organism is sensitive to the antibiotic novobiocin as shown by the zone of inhibition.

Staphylococcus saprophyticus **Growing on Blood Agar**

Note there is no hemolysis (gamma reaction) on the blood agar and the organism is resistant to the antibiotic novobiocin.

همولیزین

- مراحل:

۱) باکتری را در محیط کشت BLOOD AGARکشت خطی میدهیم و پس از انکوبه کردن نتیجه را مشاهده میکنیم .

نیترات

- مراحل:

۱) کشت باکتری با لوپ در محیط مایع نیترات

۲) پس از انکوبه کردن با افزودن معرف آلفا نفتل آمین ، سولفانیک اسید نتیجه را مشاهده میکنیم .

حساسیت به باسیتراسین

اساس تست: تعیین حساسیت استافیلوکوکوس به دیسک حاوی باسی تراسین

هدف تست: افتراق جنس میکروکوکوس از استافیلوکوکوس

دستور کار:

الف- مقداری از باکتری کشت داده شده از روی نمونه مجهول با لوپ استریل بردارید.

ب- باکتری را توسط لوپ در سطح محیط ژلوز ساده (مولر هینتون آگار) به صورت چمنی کشت دهید.

ج- با پنس استریل یک دیسک باسیتراسین 0.04 واحدی را روی منطقهٔ کشت قرار دهید.

د- پلیت را در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار دهید.

ه- تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد را بررسی نمایید.

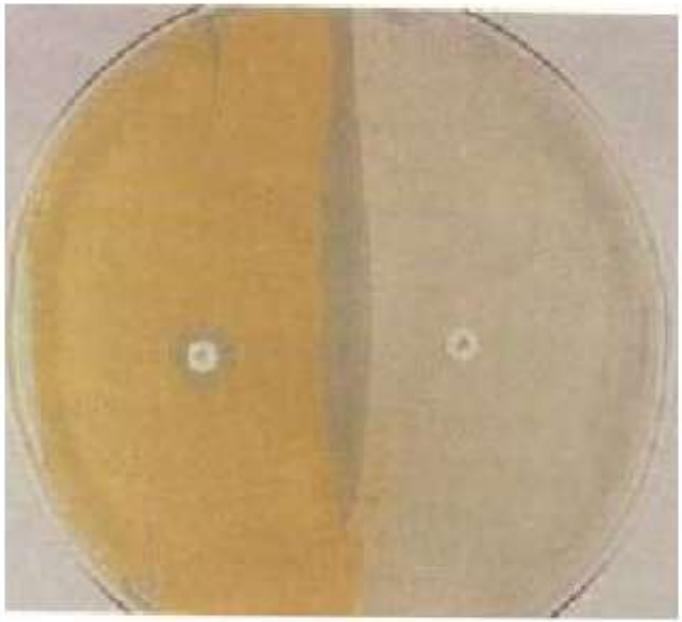
تفسیر تست

جنس استافیلوکوکوس به دیسک باسیتراسین مقاوم و جنس میکروکوکوس حساس (هاله عدم رشد در اطراف دیسک) است (شکل ۴-۳)

- مراحل:

۱) کشت نیم مک فارلند در محیط مولر هینتون آگار توسط سواپ

۲) قراردهی دیسک در وسط محیط و انکوباسیون تا نتیجه را بعدا مشاهده کنیم .



لیزوزیم

- مراحل:

۱) کشت چهارمنطقه ای باکتری در محیط کشت NA که دارای لیزوزیم است.

آزمایش۱۱: از لوله‌ی ۰/۵ مک فارلند روی محیط NA حاوی لیزوزیم کشت می‌دهیم اگر رشد کرد به لیزوزیم مقاوم است.

GEA

- مراحل:

۱) باکتری را روی محیط کشت دارای گلیسرول کشت خطی میدهیم.

آزمایش ۱۲: از باکتری مجهول روی محیط GEA (حاوی گلیسرول + ارتیرومایسین) کشت می‌دهیم. این آزمایش برای تفکیک میکروکوکوس هاست. یعنی اگر رشد کرد میکروکوکوس است.

OF (**Oxidative Fermentative**)

- مراحل:

۱) در دو لوله ی آزمایش حاوی محیط کشت OF baseباکتری را کشت میدهیم سپس روی یکی از محیط ها پارافین اضافه میکنیم تا محیط بی هوازی شود.

آزمایش ۱۳: با یک نیدل استریل مقداری از باکتری مورد نظر برداشته، در دو لوله حاوی محیط جامد O/Fbase کشت می‌دهیم روی یکی از دو لوله مقداری پارافین مایع می‌ریزیم تا شرایط بی هوازی شود. این محیط حاوی قندهای Glu ، Lac و sac است. همچنین هوازی یا بی هوازی بودن باکتری و تولید گاز یا عدم تولید گاز توسط آن بررسی می‌گردد.

اگر در هر دو رشد کرد، بی‌هوازی اختیاری است.

اگر در محیط هوازی رشد کرد، هوازی است. اگر فقط در محیط بی‌هوازی رشد کرد هوازی محیط است

منبع:

- **مهارت های آزمایشگاه میکروب شناسی** ، جلد ۱ –۳ ،

نگارش:

- دکتر علی محمدی–عضو هیئت علمی دانشگاه الزهرا (س)
- دکتر حمیده میرشفیعی – دانشگاه شهید بهشتی