به نام خدا

Bacteriology Lab 1

By: **Dr. A. Mohammadi**

Department of Biology,
Faculty of science,
University of Alzahra

fppt.com

آزمایشگاه دوم
استرپتوکوکوس

Isolation and Identification of Streptococci

fppt.com

استرپتوکوکها، کروی یا بیضی شکل و به قطر یک میکرومتر هستند، که همانند زنجیر دنبال یکدیگر قرار می گیرند. این باکتریها گرم مثبت، بی حرکت، بدون اسپور و کاتالاز منفی می باشند. استرپتوکوک ها بر اساس خصوصیات فیزیولوزیک (بیوشیمیایی)، آنتی ژنیک (لانسفیلد) و ویژگی همولیز بر روی محیط کشت خوندار جامد تقسیم بندی می شوند. ضمنا بر اساس نوع همولیز استرپتوکوکها در سه گروه آلفا (α)، بتا (β) و گاما (γ) قرار می گیرند

الف- استرپتوکوکهای آلفا **همولیتیک** : اطراف پرگنه این باکتریها بر روی ژلوز خوندار هاله ای سبز رنگ که ناشی از تبدیل هموگلوبولین به مت هموگلوبین است (همولیز ناقص یا α) مشاهده می گردد.

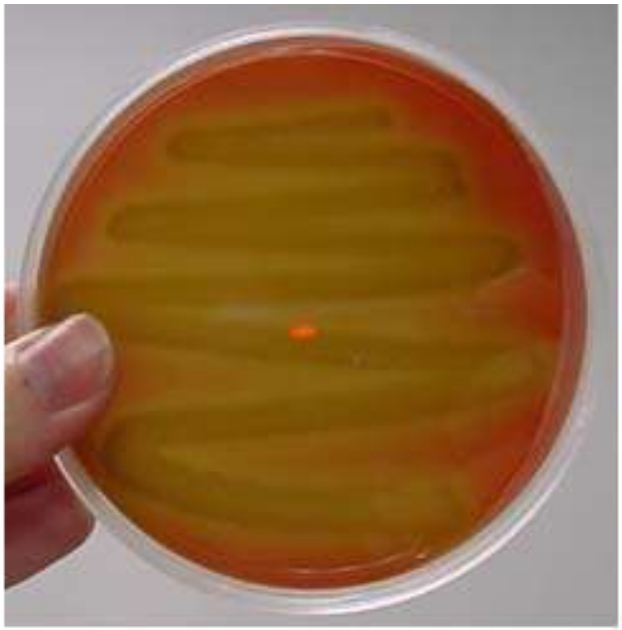
ب- استرپتوکوکهای بتاهمولیتیک : اطراف پرگنه این باکتریها بر روی ژلوز خون دار هاله ای بی رنگ که ناشی از لیز گلبول قرمز است (همولیز کامل یا همولیز β) تشکیل می شود،

ج- استرپتوکوکهای غیر همولیتیک (واکنش گاما) : اطراف پرگنـــه این باکتریهـا بـرروی ژلـوز خونـدار بدون تغییر (واکنش γ) می باشد. همولیز تولید نمی کنند.

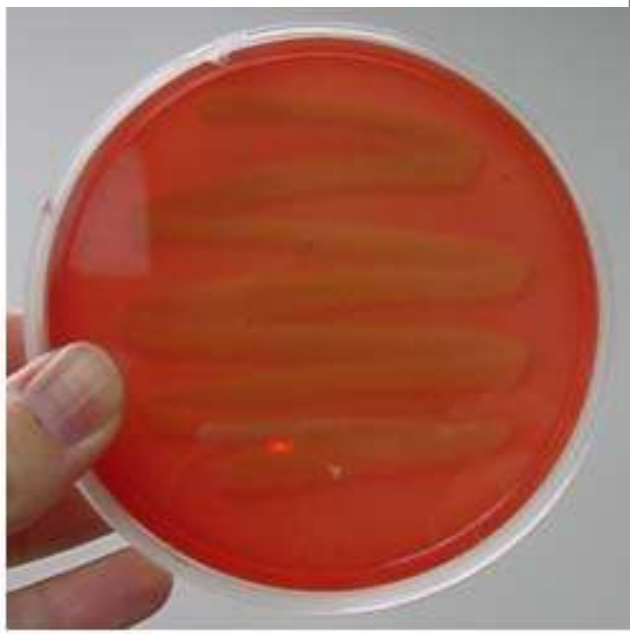
اکثر سویه هایی که در انسان تولید بیماری می نمایند، استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A می باشد عـلاوه بر گروه A گروههای C,G,L,M,D و B و استرپتوکوک پنومونیه و اسـترپتوکوکهای گـروه ویریـدانس نیـز برای انسان بیماریزا می باشند. گروه های مختلف استرپتوکک بر اساس خصوصیات ذکر شده در شـکل ۵-۱ از یکدیگر متمایز می شوند. پنوموکوکها باکتریهایی هستند بیضی شکل، به قطر یک میکرومتر شبیه به سـر نیزه یا شعله شمع که معمولاً طوری دوبدو پهلوی یکدیگر قرار می گیرنـد کـه دو انتهـای پهـن آنهـا مجـاور یکدیگر واقع می شود. این باکتریها گرم مثبت بوده و در رنگ آمیزی گرم، کپسول به شکل هاله روشـنی در اطراف باکتری مشاهده می شود. در رنگ آمیزی اختصاصی کپسول، هاله بهتر دیده می شود.

- **Hemolysis** on sheep blood agar:

Beta Hemolysis

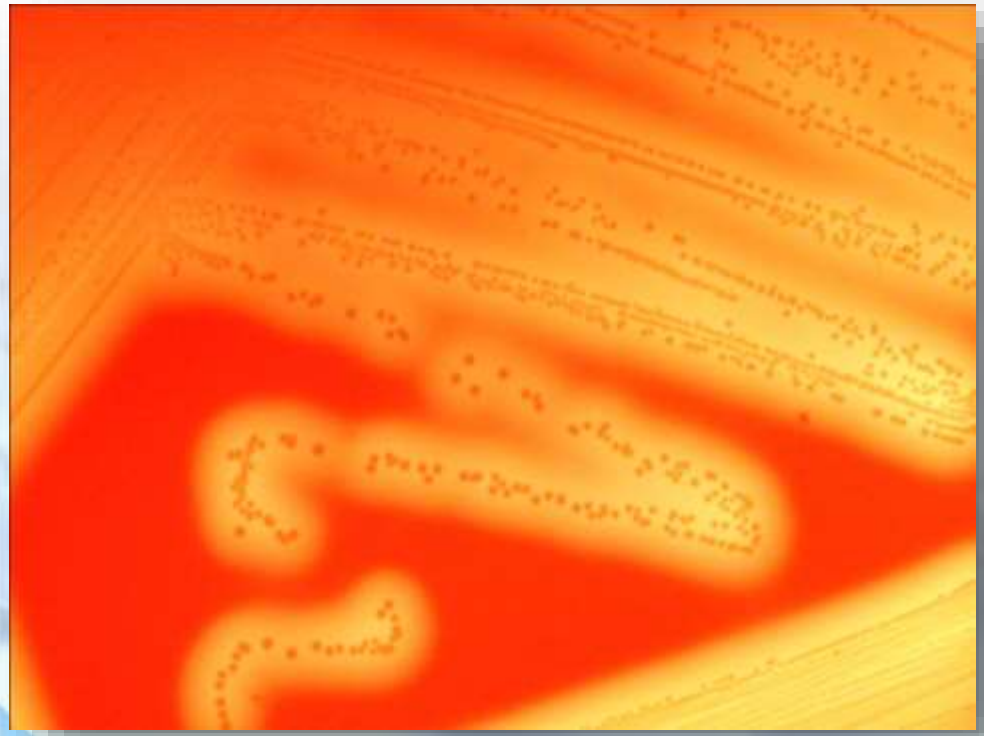


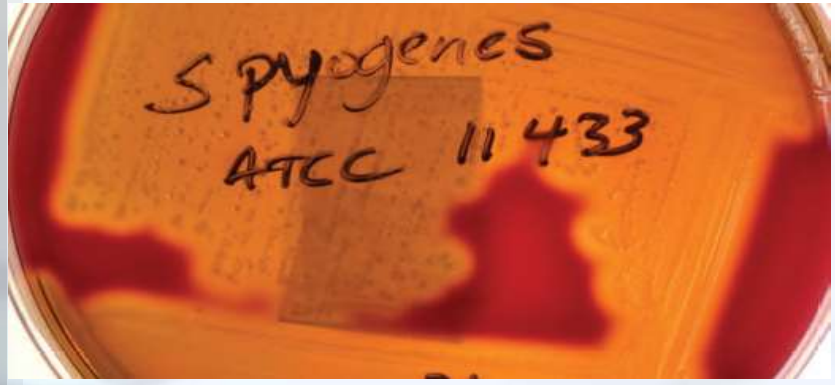
Alpha Hemolysis



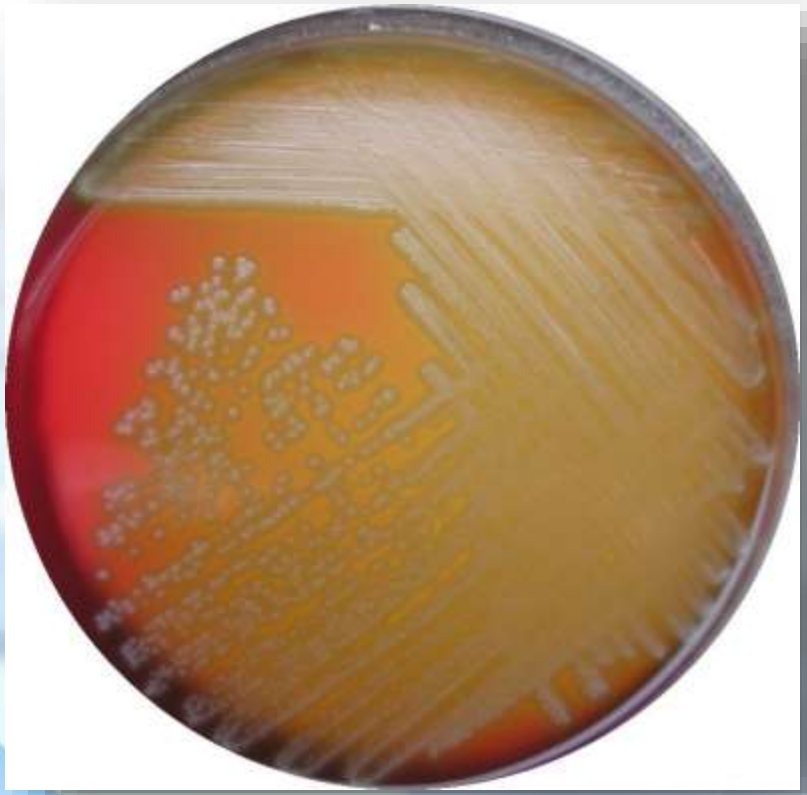
Gamma Hemolysis

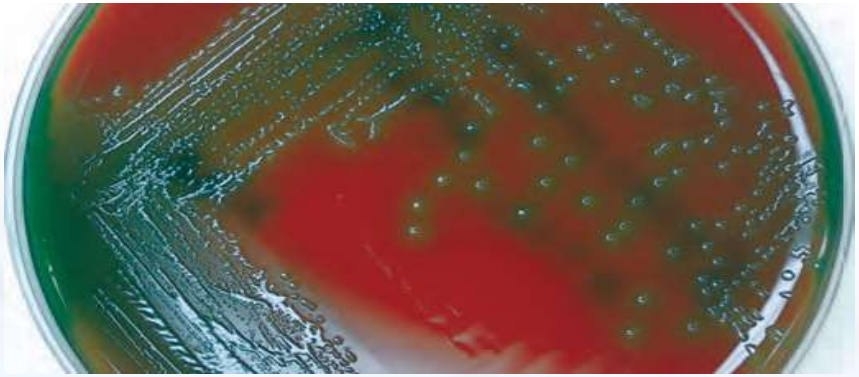
- **Beta hemolysis** refers to a clear, colorless zone surrounding the colony, where a complete lysis of the red blood cells by the hemolysins has occurred.





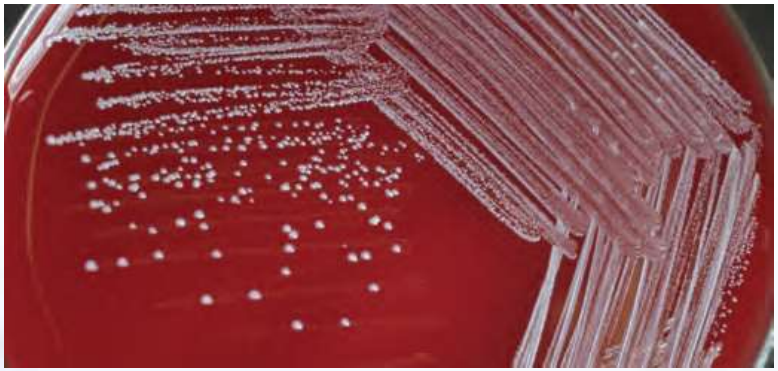
Alpha hemolysis appears as a zone of partial hemolysis surrounding the colony, often accompanied by a **greenish** or **brown** discoloration due to oxidation of hemoglobin to met-hemoglobin by hydrogen peroxide





شکل) **α همولیز**. پلیت کشت خطی استرپتوکوکوس پنومونیه نشان‌دهنده‌ی همولیز آلفا است. ناحیه متمایل به سبز اطراف کلنی‌ها به دلیل لیز ناقص سلول‌های قرمز خونی ایجاد می‌شود.

Gamma hemolysis refers to no hemolysis or discoloration of the agar surrounding the colony.



شکل) **۷ همولیز** ✦ پلیت دارای کشت خطی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس روی محیط آگار خون گوسفندی هیچ همولیزی را نشان نمی‌دهد.

همولیزین

همولیزین‌های تولید شده توسط استرپتوکوک‌ها، استرپتولیزین هم نامیده می‌شوند. آن‌ها به دو شکل – نوع O و نوع S– وجود دارند.

استرپتولیزین O، حساس به اکسیژن و در شرایط بی‌هوازی دارای بیشترین فعالیت می‌باشد.

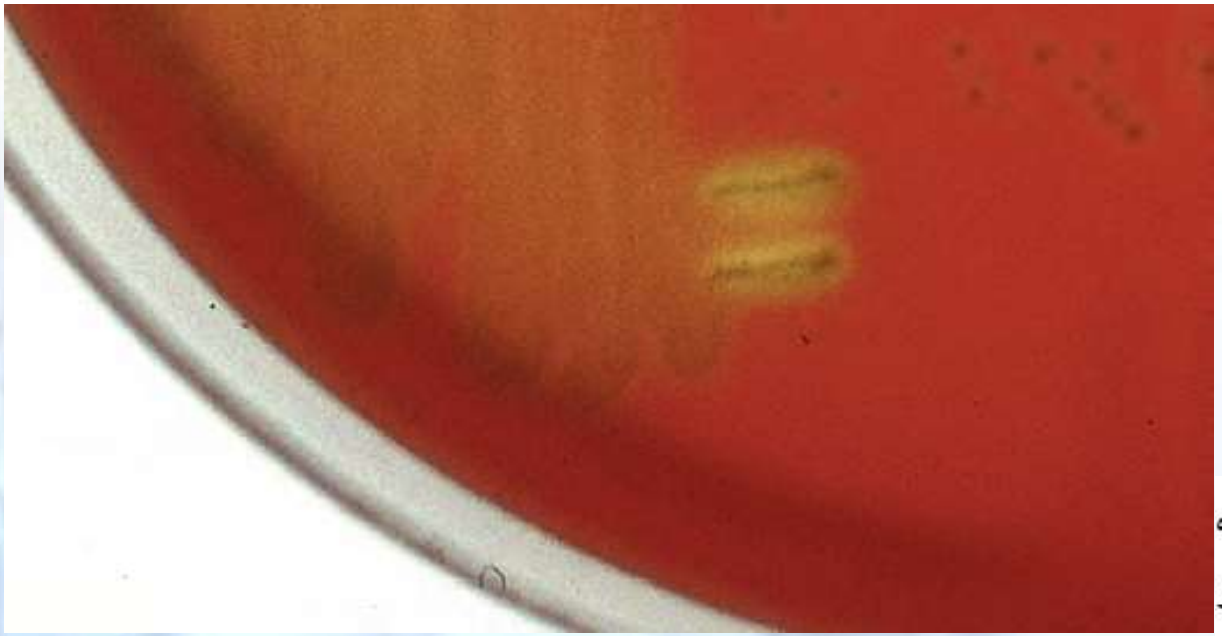
استرپتولیزین S، مقاوم به اکسیژن بوده ولی در شرایط بی‌هوازی به طور بهینه و به خوبی، بیان می‌شود.

ساده‌ترین روش آماده‌سازی یک محیط مناسب برای استرپتولیزین‌ها در محیط آگار خون‌دار، تکنیک عمقی–خطی (Streak–stab technique) می‌باشد.

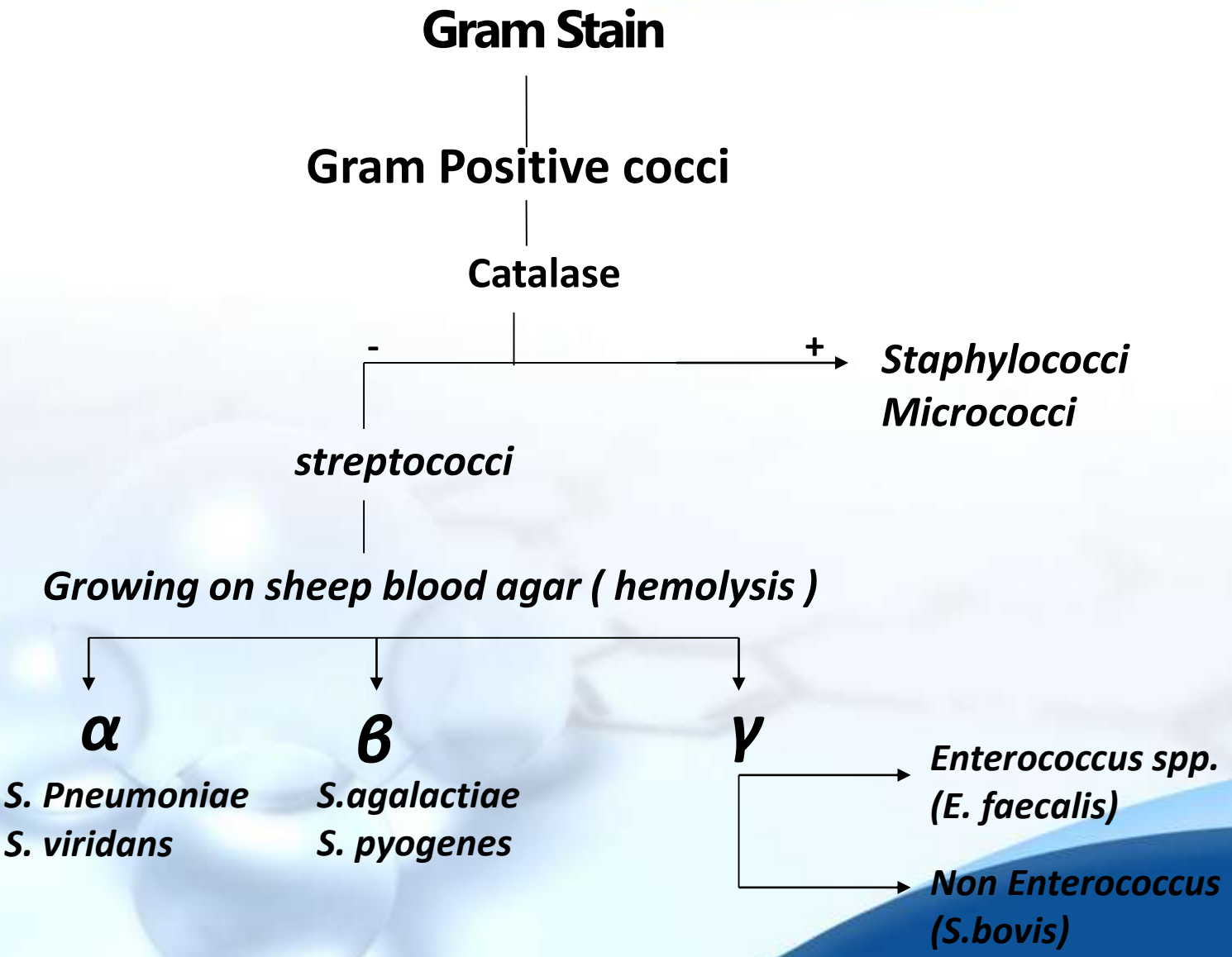
در این روش، ابتدا پلیت آگار خون‌دار را به منظور جداسازی به صورت خطی و سپس به صورت عمقی کشت داده می‌شود. کشت عمقی به دلیل غلظت کم اکسیژن محیط زیر سطح پلیت، موجب تقویت فعالیت استرپتولیزین می‌شود .

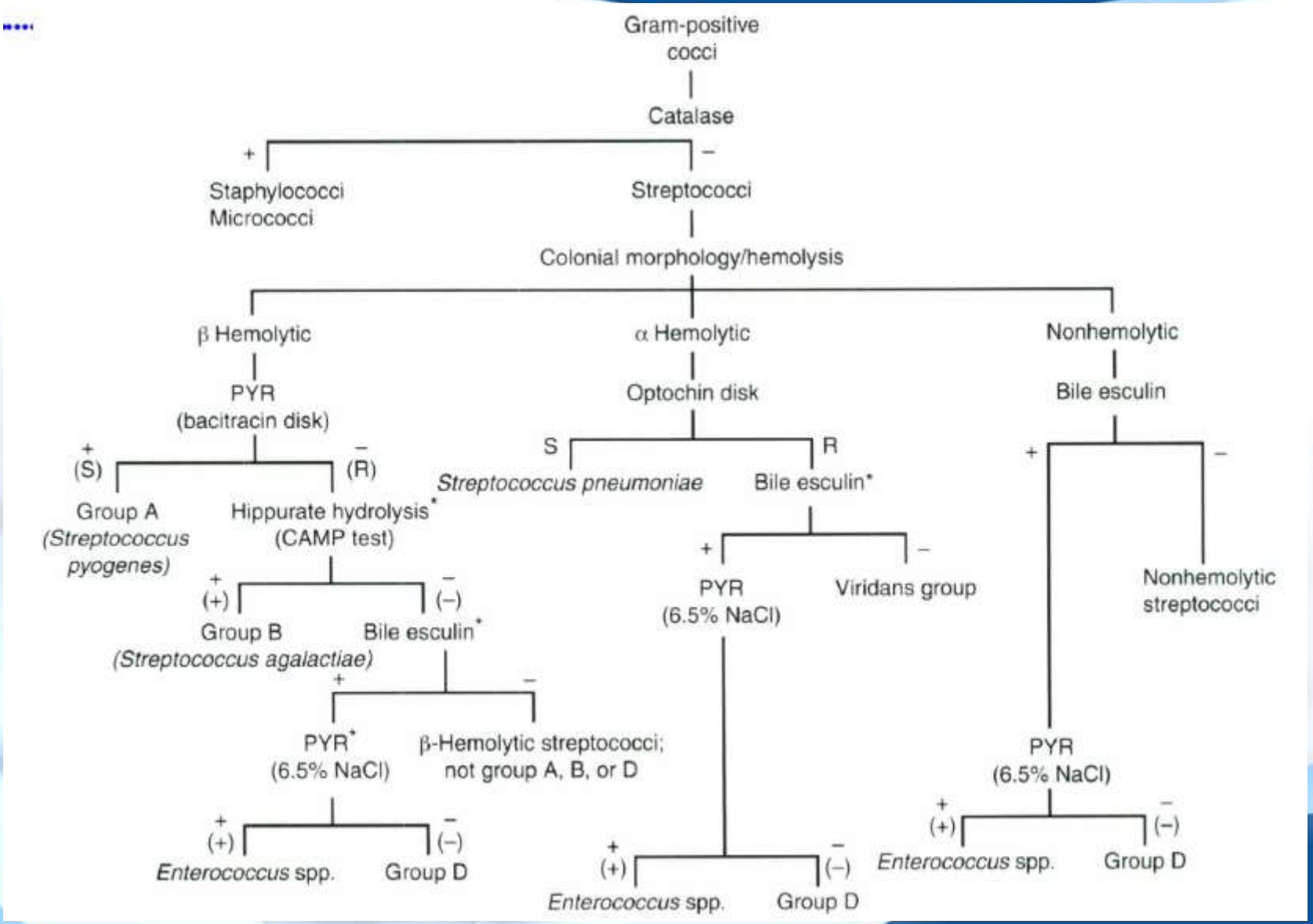
شکل) **همولیز هوازی و بی‌هوازی**

✦ نمونه کشت گلو شناسایی نشده زمانی که روی سطح رشد می‌کند، دارای همولیز آلفا و در اطراف مناطق فرو بردن لوپ، همولیز بتا (پیکان) را نشان می‌دهد. این نوع مشاهده ناشی از تولید همولیزین حساس به اکسیژن است.



۵) بعد از تکمیل کشت خطی، با استفاده از لوپ، آن را در دو یا سه مکان اولین خطوط الگوی کشت خطی و سپس دو یا سه مکانی که قبلاً تلقیح نشده است، در آگار فرو ببرید.


Gram Stain
Gram Positive cocci
Catalase
-
+
Staphylococci
Micrococci
streptococci
Growing on sheep blood agar (hemolysis)
α
β
γ
S. Pneumoniae
S. viridans
S.agalactiae
S. pyogenes
Enterococcus spp.
(E. faecalis)
Non Enterococcus
(S.bovis)


Gram-positive cocci
Catalase
+
–
Staphylococci
Micrococci
Streptococci
Colonial morphology/hemolysis
β Hemolytic
α Hemolytic
Nonhemolytic
PYR (bacitracin disk)
Optochin disk
Bile esculin
+ (S)
– (R)
S
R
Group A (Streptococcus pyogenes)
Hippurate hydrolysis* (CAMP test)
Streptococcus pneumoniae
Bile esculin*
+
–
+ (+)
– (–)
Group B (Streptococcus agalactiae)
Bile esculin*
PYR (6.5% NaCl)
Viridans group
Nonhemolytic streptococci
+
–
PYR* (6.5% NaCl)
β-Hemolytic streptococci; not group A, B, or D
PYR (6.5% NaCl)
+ (+)
– (–)
Enterococcus spp.
Group D
+ (+)
– (–)
Enterococcus spp.
Group D
+ (+)
– (–)
Enterococcus spp.
Group D

استرپتوکوک پیوژنز:

کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که در گروه A طبقه بندی لنسفیلد قرار می‌گیرد.

استرپتوکوک پیوژنز هنگامی که بر روی آگار خون دار رشد می‌کند، بتا همولیتیک است.

استرپتوکوک‌ها از نظر تولید آنزیم کاتالاز، منفی هستند.

این طور تصور می‌شود که سالیانه ۷۰۰ میلیون عفونت توسط این باکتری ایجاد می‌شود که ۶۵۰ هزار مورد از آن‌ها شدید هستند.

میزان مرگ و میر عفونت‌های ایجاد شده توسط استرپتوکوک پیوژنز حدود ٪۲۵ است.

عامل بیماریهای مهم: فارنژیت (گلودرد چرکی)، زرد زخم، باد سرخ، سلولیت، فاسئیت نکروزان، مخملک و سندرم شوک توکسیک، بیماری‌های خود ایمنی (پروتئین M)

انتروکوک فکالیس

پیشتر، این باکتری همراه با استرپتوکوک های گروه Dطبقه بندی می‌شد.

انتروکوک فکالیس، باکتری همزیست روده انسان و سایر پستانداران است. همچنین در برخی از مکمل‌های غذایی پروبیوتیکی نیز بکار می‌رود.

انتروکوک فکالیس در ایجاد عفونت های بیمارستانی نقش دارد.

این باکتری بطور ذاتی به بسیاری ازآنتی بیوتیک‌ها مقاوم است.

انتروکوک فکالیس در کانال ریشه دندان‌هایی که تحت دستکاری های دندانپزشکی قرار گفته‌اند نیز بطور گسترده دیده شده‌است.

انتروکوک فکالیس، غیر متحرک و بی‌هوازی اختیاری است. گلوکز را بدون ایجاد گاز تخمیر می‌کند و کاتالاز منفی است. اگر بر روی آگار خون‌دار رشد کند، واکنش کاتالاز مثبت کاذب است. این باکتری، شیر لیتموس را احیا کرده اما ژلاتین را مایع نمی‌کند.

۱–کاتالاز (لامی)

اساس تست: تشخیص حضور آنزیم کاتالاز

هدف تست: افتراق جنس استافیلوکوکوس از جنس استرپتوکوکوس

دستور کار:

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

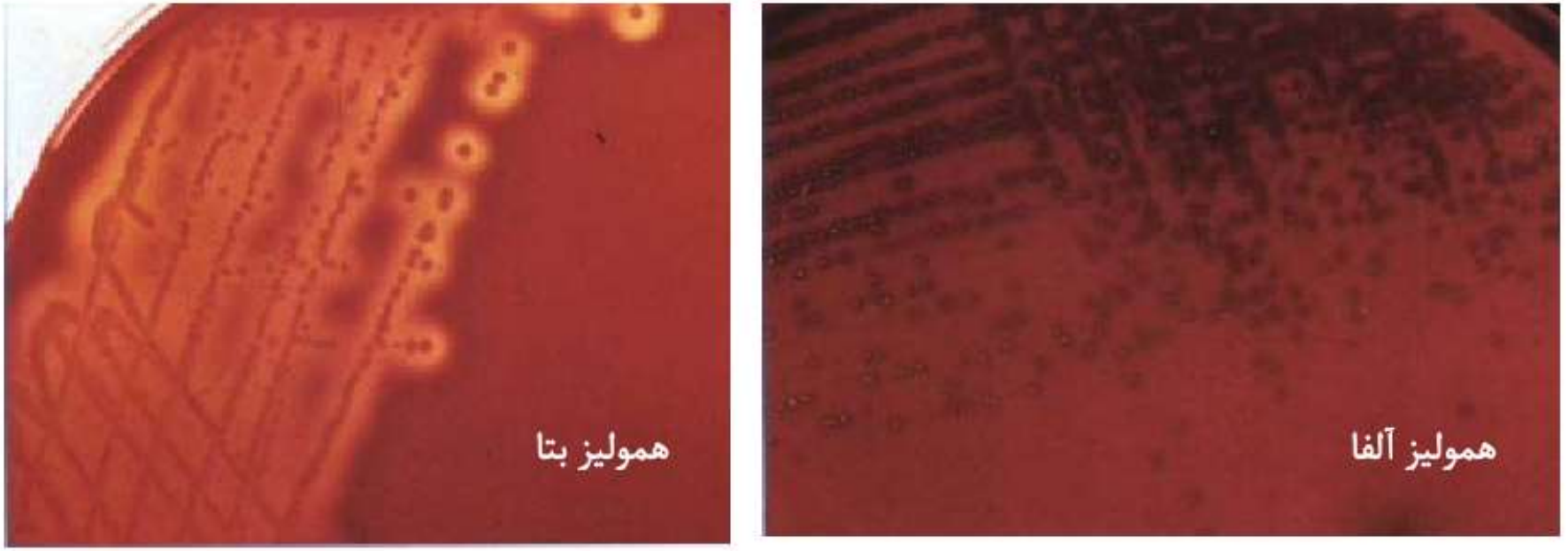
ب) تشکیل سریع حباب های گاز (O_2) مورد بررسی قرار می گیرد.

۲- همولیزین

مراحل:

۱) باکتری فکالیس و پایوجنز را در محیط کشت BLOOD AGAR کشت خطی میدهیم (دو قسمتی) و پس از انکوبه کردن نتیجه را مشاهده میکنیم . (به صورت عمقی هم تلقیح کنید)

۴- مشاهده انواع همولیز برروی ژلوز خوندار (شکل ۵-۴)



شکل ۵-۴. انواع همولیز در استرپتوکوک ها

۳–حساسیت به باسیتراسین

اساس تست: تعیین حساسیت استرپتوکوکوس به دیسک حاوی باسیتراسین

هدف تست: افتراق استرپتوکوک β همولیتیک گروه A از سایر استرپتوکوکهای بتاهمولیتیک

دستور کار: پلیت را به دو قسمت

الف- لوپ استریل شود

ب- باکتری مجهول با لوپ برداشته شود

ج- به صورت چمنی در سطح محیط ژلوز خوندار کشت داده شود

د- با پنس استریل یک دیسک باسیتراسین 0.04 واحدی را روی منطقهٔ کشت قرار داده شود

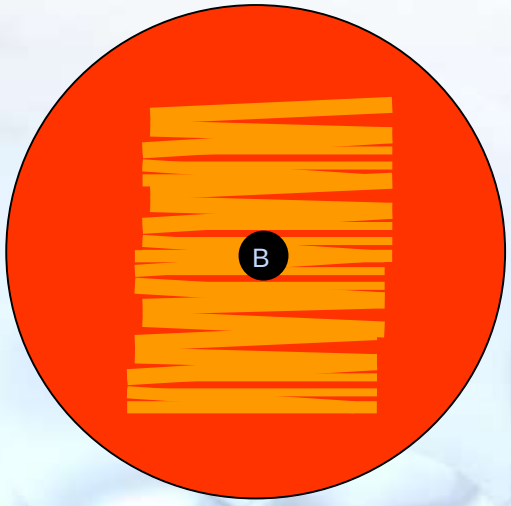
ه- پلیت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار گیرد

ه- تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گیرد.

Bacitracin Sensitivity Test:

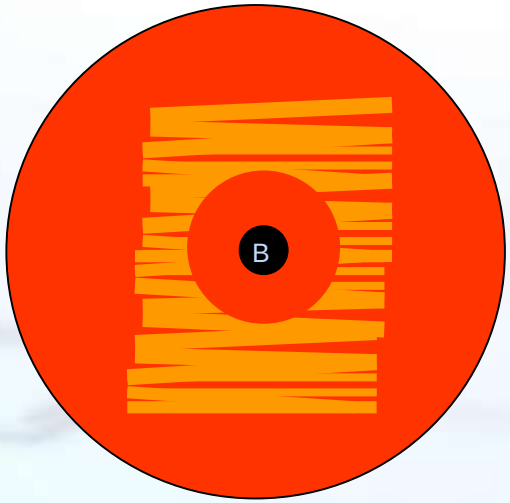
Results:

Positive test: any zone of inhibition around the disc.



Bacitracin Resistant

S.agalactiae



Bacitracin Sensitive

S.pyogenes

Bacitracin Sensitivity Test:

تفسیر تست

۹۵٪ از استرپتوکوکهای گروه A نسبت به دیسک باسیتراسین ۰/۰۴ واحدی، حساسیت نشان می دهنـد، در صورتی که سایر استرپتوکوکها نسبت به آن مقاومت دارند (شکل۵-۵).

۴– بایل اسکولین

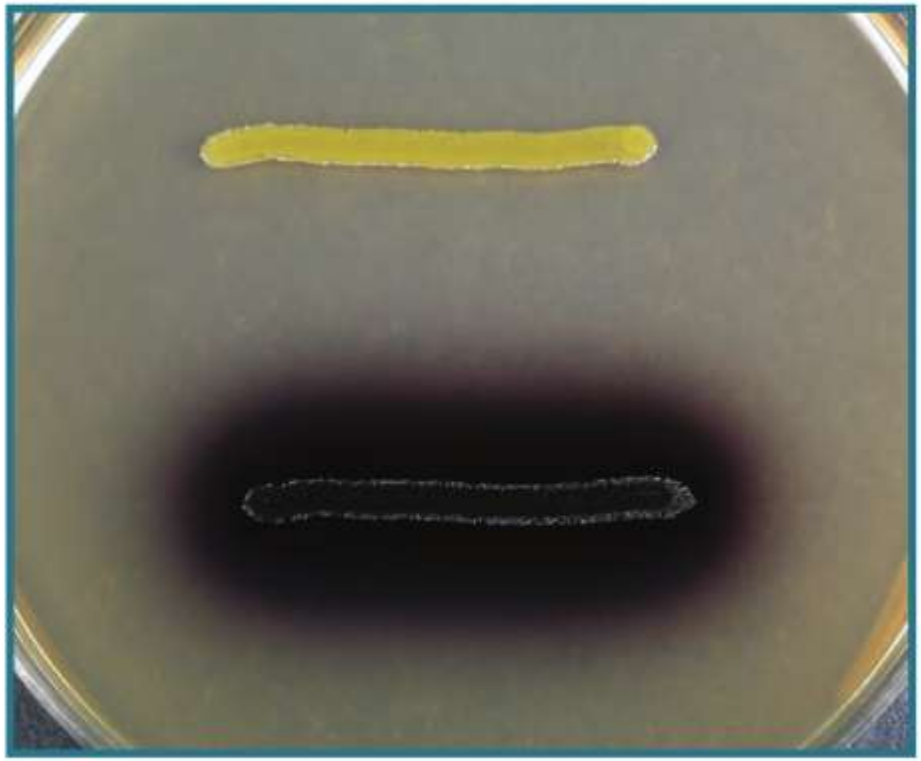
کاربرد: آزمون بیل اسکولین[1] (BET) اغلب برای شناسایی احتمالی انتروکوک‌ها و اعضای گروه استرپتوکوکوس بوویس که همگی گرم مثبت هستند، استفاده می‌شود. در واقع این آزمون جهت افتراق استرپتوکوک‌های گروه D از استرپتوکوک‌های غیر گروه D به کار می‌رود.

اساس تست: تعیین توانایی یک ارگانیسم جهت هیدرولیز اسکولین قندی به اسکولتین و گلوکز در حضور بایل

Bile Esculin Test

صفرا نیز به عنوان یک عامل انتخابی جهت جداسازی گروه استرپتوکوکوس بوویس و انتروکوک¬ها از دیگر استرپتوکوک¬ها به محیط افزوده شده است. ضمن اینکه سیترات فریک به عنوان منبع آهن اکسید شده برای نشان دادن یک تست مثبت در این محیط وجود دارد.

بسیاری از باکتری‌ها قادرند اسکولین را در شرایط اسیدی هیدرولیز کنند و بسیاری از باکتری‌ها خصوصاً انتریک¬های گرم منفی نیز قادرند صفرا را تحمل نمایند. با این حال، در میان استرپتوکوک¬ها، به طور معمول تنها انتروکوک¬ها و گروه استرپتوکوکوس بوویس (**S.equinus, S. gallolyticus, S. infantarius, and S. alactolyticus)** می‌توانند صفرا را تحمل کرده و اسکولین را هیدرولیز کنند.



4-5 Bile Esculin Test Results ✦ This plate was inoculated with two Gram-positive cocci. The organism on the bottom is bile esculin-positive. The organism on the top is negative.

در این آزمایش، در تجزیه اسکولین به اسکولتین و گلوکز، اسکولتین حاصله با آهن (Fe^{+3}) سیترات فریک واکنش نشان داده و یک رسوب قهوه‌ای تیره ایجاد می‌کند .

از نظر آزمون بیل اسکولین، مثبت در نظر گرفته می‌شود و در نقطه مقابل اگر قابلیت چنین کاری را نداشته باشد، منفی در نظر گرفته می‌شود

TABLE OF RESULTS

Result	Interpretation	Symbol
Medium is darkened within 48 hours	Presumptive identification as a member of Group D *Streptococcus* or *Enterococcus*	+
No darkening of the medium after 48 hours	Presumptive determination as not a member of Group D *Streptococcus* or *Enterococcus*	–

دستور کار:

الف) با استفاده از لوپ استریل مقداری از باکتری مورد نظر را بر روی محیط بایل اسکولین کشت دهید.

ب) محیط کشت داده شده را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار دهید.

ج) محیط را جهت تغییر رنگ (رنگ سیاه) بررسی نمایید.

تفسیر تست

استرپتوکوک های گروه D و انتروکوک ها قادر به هیدرولیز اسکولین بوده رنگ محیط را تغییر داده آن را تیره می کنند.

کنترل مثبت: *Enterococcus faecalis* ATCC29212

کنترل منفی: *Streptococcus pyogenes* ATCC19615

۵– کشت بر روی محیط حاوی ۶/۵٪ نمک

اساس تست: توانایی ارگانیسم جهت رشد در حضور ۶/۵٪ نمک

هدف تست: جداسازی جنس انتروکوک از استرپتوکوک های گروه D

دستور کار:

الف- لوپ استریل شود

ب- نمونه مجهول با لوپ از محیط جامد برداشته و به لوله حاوی محیط مایع و ۶/۵٪ نمک منتقل شود.

ب) پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۴-۱۸ ساعت، لوله ها جهت مشاهده رشد بررسی شود.

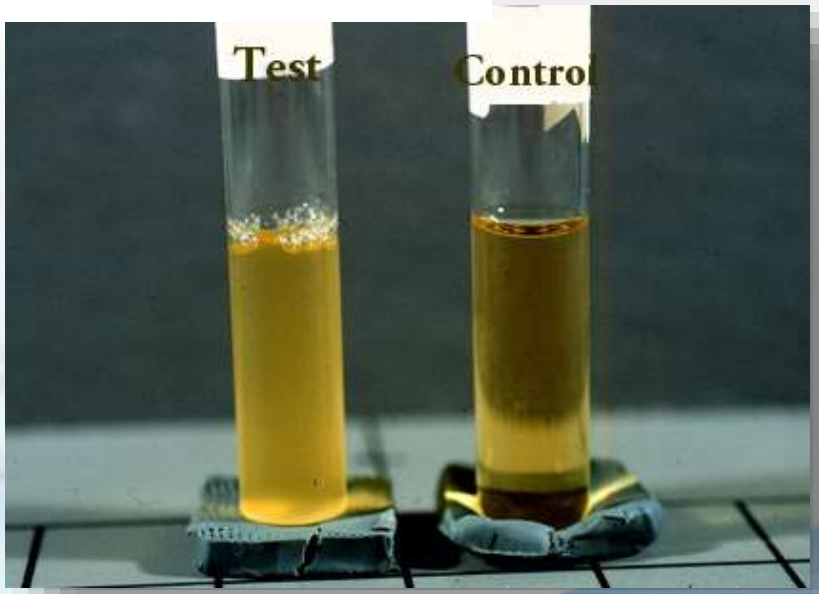
6.5% NaCl medium

- Enterococcus spp. Grow well in 6.5% NaCl medium(6.5%NaCl in brain heart infusion broth) but *S.bovis* will not.

تفسیر تست

گونه های جنس انتروکوک در حضور ۶/۵٪ نمک رشد کرده محیط را کدر می نمایند، اما استرپتوکوک های گروه D قادر به رشد نبوده و محیط شفاف باقی می ماند

Negative after 24hrs
S.bovis



Positive after 24hrs
Enterococcus spp.

۶–تست کمپ

اساس تست: به منظور تعیین توانایی استرپتوکوک جهت تولید و آزاد کردن فاکتور کمپ به کـار مـی رود.

فاکتور کمپ با حضور بتا همولیزین (بتا لیزین) استافیلوکوکوس اورئوس در محیط ژلوز خوندار باعث تشـدید پدیده همولیز در مرز بین دو ارگانیسم می شود.

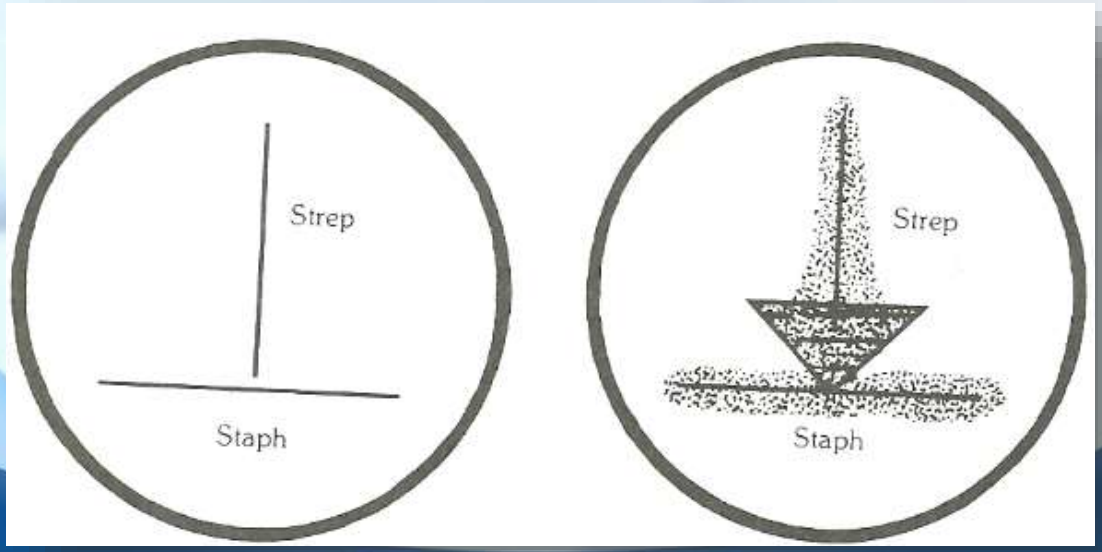
هدف تست: افتراق و تشخیص احتمالی استرپتوکوک های بتا همولیتیک گروه B از سایر استرپتوکوک ها

تست کمپ

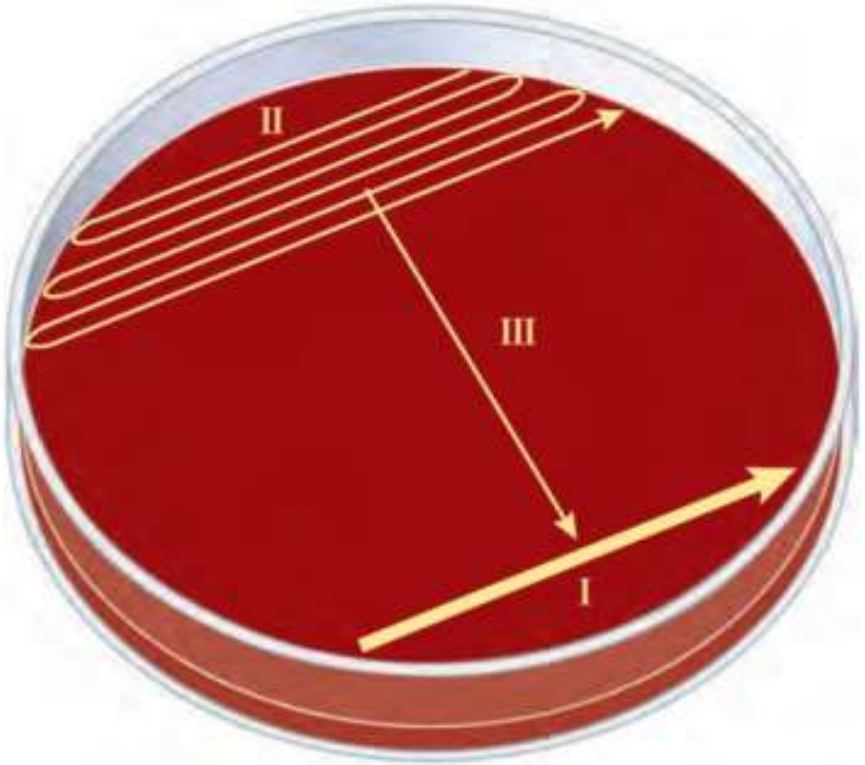
برای افتراق استرپتوکوکوس آگالاکتیه گروه B (+) از سایر گونه‌های استرپتوکوکوس (–) استفاده می‌شود.

استرپتوکوکوس آگالاکتیه گروه B یک پروتئین همولیتیک به نام فاکتور CAMP تولید می‌کند که به صورت هم‌افزایی (سینرژیک) با بتاهمولیزین استافیلوکوکوس اورئوس زیرگونه اورئوس همکاری می‌کند.

زمانی که خطی از نمونه مجهول باکتری به صورت عمود بر استافیلوکوکوس اورئوس زیرگونه اورئوس روی آگار کشت می‌شود (شکل)، تشکیل ناحیه همولیز شبیه نوک پیکان به منزله‌ی مثبت بودن نتیجه می‌باشد.



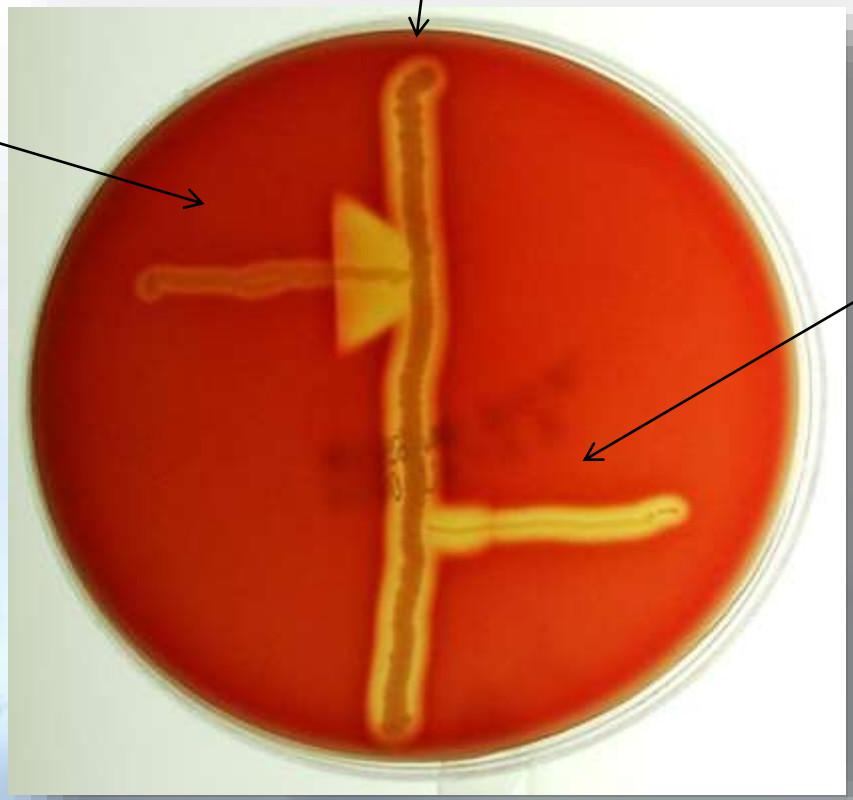
شکل) **نحوه تلقیح روی پلیت در تست CAMP**. دو تلقیح در این تست انجام می‌شود. ابتدا یک خط در امتداد یک لبه پلیت آگار خون‌دار از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس زیرگونه اورئوس بکشید (۱). سپس ایزوله‌ای که مجهول است را به صورت متراکم و پر در لبه دیگر پلیت مقابل استافیلوکوکوس اورئوس تلقیح کنید (۲). در نهایت یک خط از داخل کشت خطی به سمت کشت استافیلوکوکوس بکشید و توجه داشته باشید که با کشت استافیلوکوکوس اورئوس تماس پیدا نکند.



CAMP test :

Beta-hemolytic *Staphylococcus aureus*

S.agalactiae



Beta hemolytic Streptococci not *S.agalactiae*

دستور کار:

الف- سویه استافیلوکوکوس اورئوس(ATCC 25923) مولد بتا همولیزین را به صورت خط مستقیم در روی ژلوز خوندار (خون گوسفند) کشت دهید

ب- ارگانیسم مورد بررسی را به طول ۳-۲ سانتی متر و عمود بر خط کشت استافیلوکوکوس بدون قطع آن کشت دهید

ج- پلیت های کشت داده شده به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور $35^{\circ}c$ و در شرایط هوازی قرار دهید.

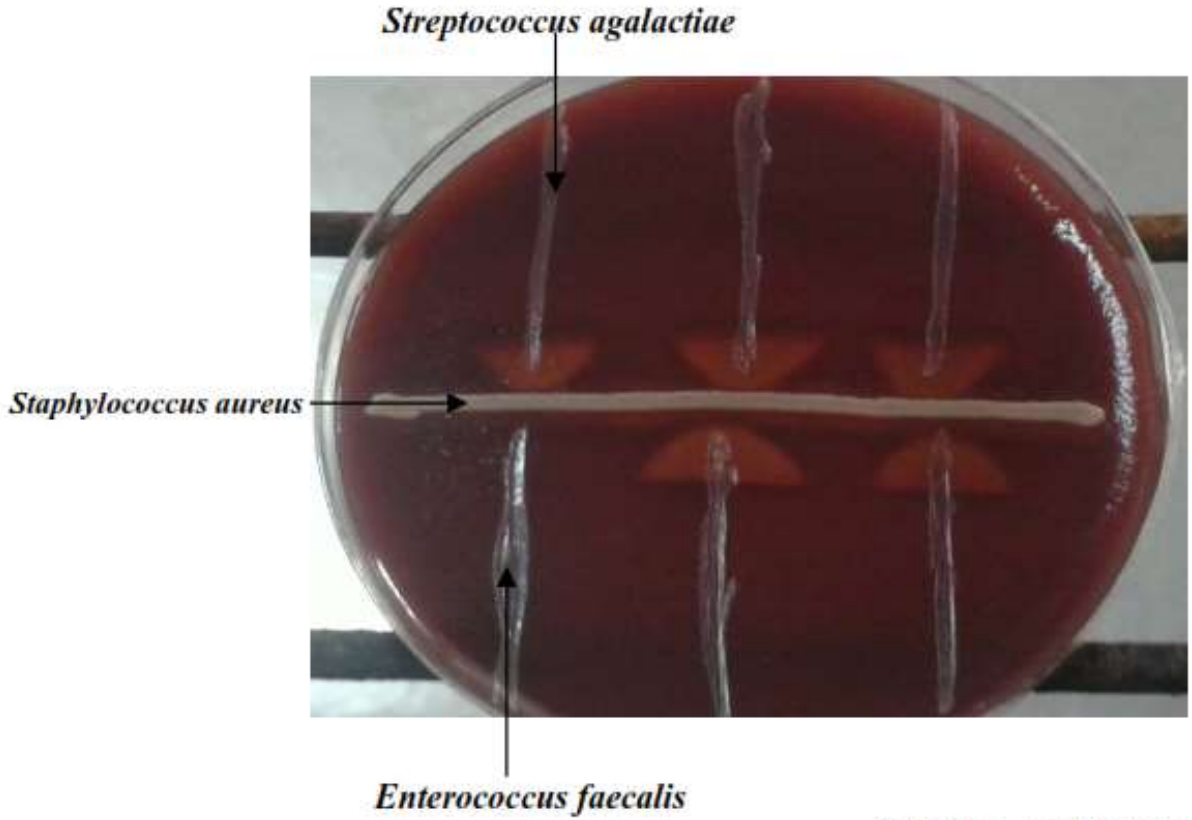
د- پلیت ها را جهت مشاهده همولیز و شکل آن بررسی کنید.

تفسیر تست

دراسترپتوکوکهای گروه B تشدید همولیز به شکل نوک پیکان دیده می شود (شکل ۵-۷).

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

استرپتوکوک بتاهمولیتیک گروه A (استرپتوکوک پیوژن) + همولیز



شکل ۵-۷: تست CAMP

تست های اضافی

fppt.com

Pyrrolidonyl-beta-naphthylamide (PYR) test

S.pyogenes posses the enzyme **L-pyroglutamyl aminopeptidase** which hydrolyzes **Pyrrolidonyl-*beta*-naphthylamide** with the formation of free β- naphthylamine, which combines with cinnamaldehyde reagent to form a bright- red end product.

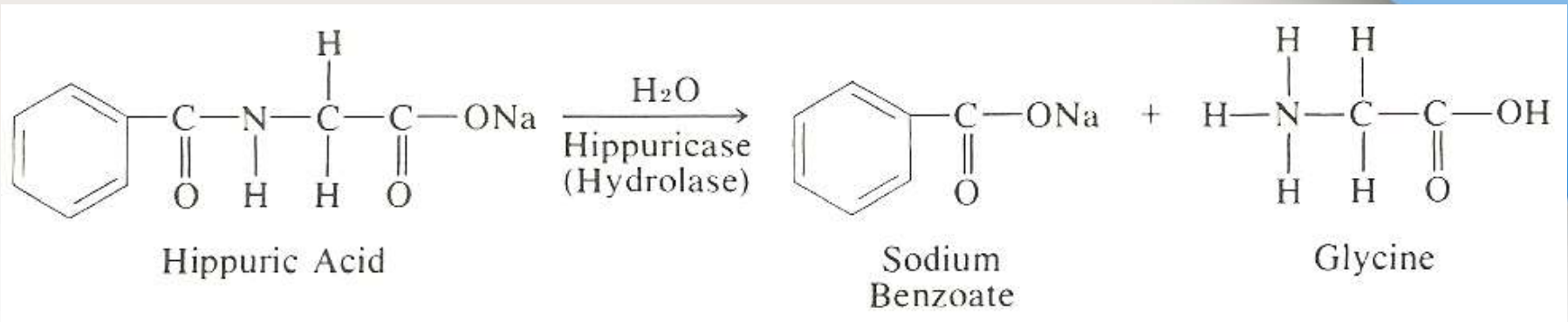
Method :

Rub a small amount of a colony to be tested on a surface of a filter paper impregnated with PYR (available commercially).

Add one drop of freshly reconstituted detector reagent N,N- dimethylaminocinnamaldehyde, with detergent (available commercially), and observe for a red color within 5 minutes.

fppt.com

Hippurate hydrolasis test:



Group B streptococci contain the enzyme hippuricase , which can hydrolyze hippuric acid . Other β streptococci lack this enzyme .

The production pf hippuricase results in the hydrolysis of sodium hippurate With the formation of sodium benzoate and glycine .

The hydrolysis of hippurate can be detected by one of two methods:

- *Standard test for benzoate using ferric chloride*
- *Rapid test for glycine using ninhydrin reagent*

fppt.com

Standard test for benzoate using ferric chloride

Media and reagent:

Sodium hippurate medium

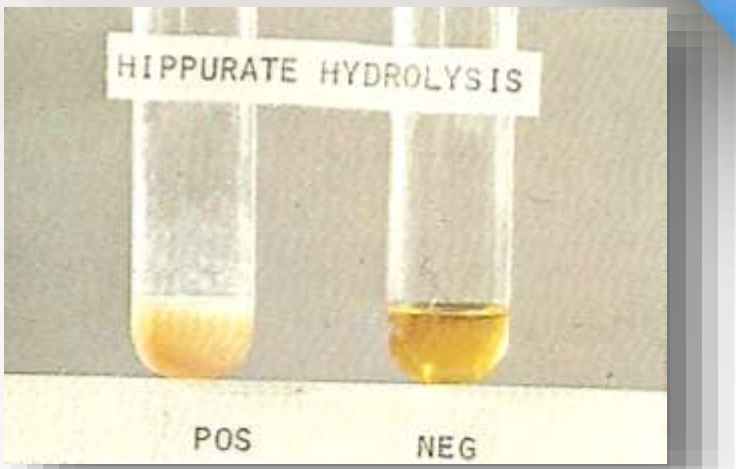
Brain Heart infusion broth.

1% Sodium hippurate.

Ferric chloride reagent

$FeCl_3$ 12g.

2% aqueous HCl 100 ml.



Procedure :

Incubate a tube of sodium hippurate medium with the organism.

Incubate for 20 hours or longer at 37 ^{O}C.

Centrifuge the medium to pack the cells and pipette 0.8 ml of the clear supernatant in to a clean test tube.

Add 0.2 ml of the ferric chloride reagent and mix.

Result:

A heavy precipitate will for upon addition of $FeCl_3$ reagent.

fppt.com

Rapid test for glycine using ninhydrin reagent

Media and reagent:

Sodium hippurate medium

1% Sodium hippurate.
Distilled water.

Ninhydrin reagent

Ninhydrin 3.5 g.
1: 1 Acetone/butanol 100 ml.

Procedure :

Incubate a large loop of a β streptococci culture in to 0.4 ml of the sodium hippurate medium and incubate for 2 hours at 37 ^{O}C.
Add 0.2 ml of the ninhydrin reagent.

Result:

The presence of a deep purple color after the adition of ninhydrin reagent within 10 minutes indicate the presence of glycine.

fppt.com

Quellung Reaction

Around the turn of the century (1900) German physician and bacteriologist Friedrich Neufeld discovered that antibodies against specific pneumococcal capsular antigens could be produced and used for typing *Streptococcus pneumoniae* organisms.

These antibodies, when bound to the cell wall antigen produced a clearing around each individual cell with the appearance of the capsule having swollen. The word **"Quellung"** is German for **'swelling'** however this is a misnomer as the capsule does not swell but simply appears enlarged with the clear zone produced by the bound antibodies.

The clearing is best visualized by using a stain to enhance contrast between the clear zone of bound antibody and the surrounding material.

fppt.com

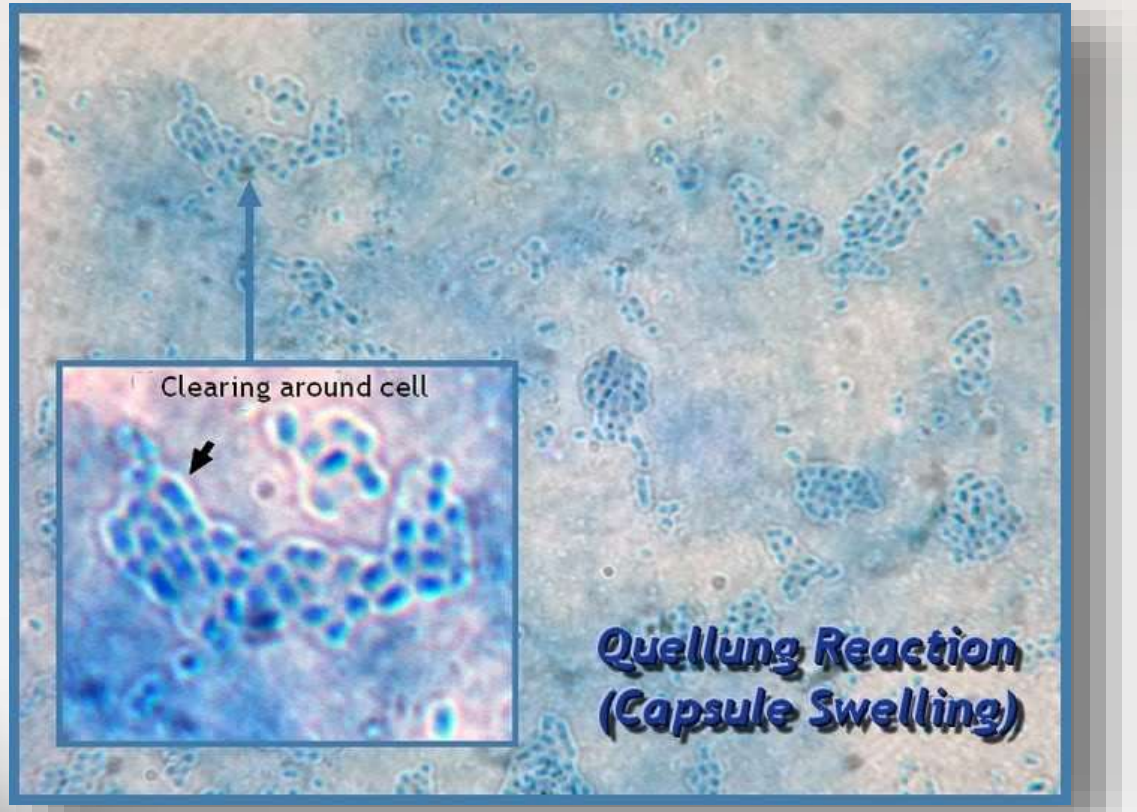
Procedure:

- Colony isolate, is placed on a clean microscope slide and allowed to dry.
- A drop of *Polyvalent Quellung antisera is applied to the slide and mixed with a drop of methyene blue stain.
- A coverslip is place onto the mixture and allowed to incubate/react at room temperature for 15-20 minutes.
- The slide is then examined under the microscope for distinct clearing around the cells.
- One may have to search for a microscopic field which best shows the clearing. A distinct zone of clearing indicates a positive Quellung reaction and confirms the identification as *Streptococcus pneumoniae*.

***Polyvalent Antisera**- contains all known serotypes to identify any pneumococcus. Specific or individual antisera can be employed for scientific study of individual serotypes.

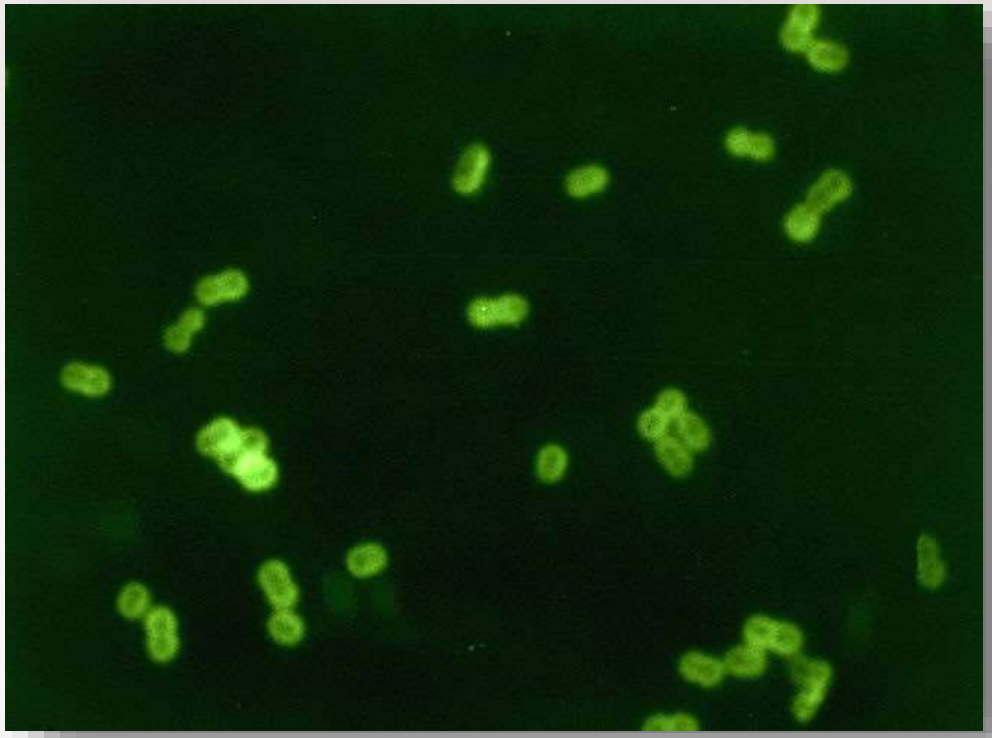
fppt.com

Quellung Reaction



fppt.com

Fluorescent antibody (*FA*) *staining*



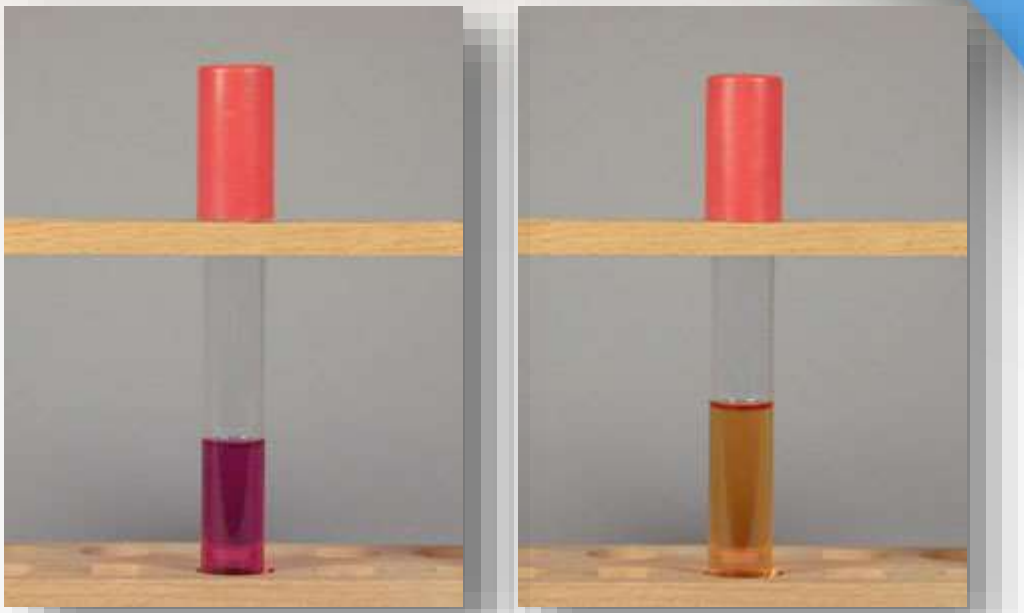
***Streptococcus pneumoniae*, FA stain showing its antiphagocytic capsule (CDC).**

fppt.com

Streptococcus faecalis broth (SF broth) :

Media and reagent:

Tryptone
D-glucose
Monopotassium phosphate
Dipotassium phosphate
Sodium azide
Sodium chloride
Bromocresol purple
pH= 6.9



Principle:

The tryptone and dextrose supply the nutrients required for the growth of enterococci. Sodium azide exhibits a bacteriostatic effect on gram-negative bacteria through its inhibitory action on enzymes in the electron transport system. Bromcresol purple serves as a pH indicator.

fppt.com

Pyrrolidonyl-beta-naphthylamide (PYR) test

Enterococcus spp. Posses the enzyme **L-pyroglutamyl aminopeptidase** which hydrolyzes **Pyrrolidonyl-*beta*-naphthylamide** with the formation of free β- naphthylamine, which combines with cinnamaldehyde reagent to form a bright- red end product.

Method :

Rub a small amount of a colony to be tested on a surface of a filter paper impregnated with PYR (available commercially).

Add one drop of freshly reconstituted detector reagent N,N- dimethylaminocinnamaldehyde, with detergent (available commercially), and observe for a red color within 5 minutes.

fppt.com

حساسیت به اپتوکین

اساس تست: تعیین حساسیت باکتری مجهول نسبت به اپتوکین

هدف تست: افتراق پنوموکوک (استرپتوکوکوس پنومونیه) از استرپتوکوکوس های گروه ویریدانس (آلفا همولیتیک ها)

fppt.com

α -hemolytic Sterptococci

- ***S.pneumoniae***
- ***S. viridans***

Optochin Sensitivity Test:

Definitive test to differentiate between

- *S. pneumoniae* & viridans Streptococci

Principle:

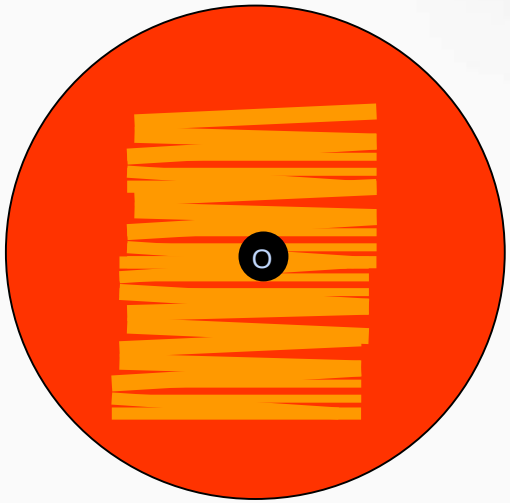
S.pneumoniae is inhibited by less than 5 µg/ml Optochin reagent (ethylhydroxycupreine hydrochloride) giving a zone of inhibition.

fppt.com

Optochin Sensitivity Test:

Procedure:

1. Inoculate blood agar plate with the test organism.
2. Aseptically apply Optochin disc onto the center of the streaked area.
3. Incubate the plate at 37°C for 24 hrs.
4. Accurately measure the diameter of the inhibition zone around the disc.



fppt.com

Optochin Sensitivity Test:

Results:

Sensitive with inhibition zone equal or more than 14 mm when disk with diameter equal 6 mm or 16 when 10 mm disk is used.

Dr.A.Mohammadi

fppt.com

دستور کار:

الف- لوپ استریل شود

ب- نمونه مجهول با لوپ برداشته شود

ج- به صورت چمنی در سطح محیط ژلوز خوندار کشت داده شود

ج- با پنس استریل یک دیسک اپتوکین (۵ µg) روی منطقهٔ کشت قرارگیرد (قطر دیسک اپتوکین مورد استفاده ۶ میلی متر باشد)

د- پلیت به صورت وارونه در داخل جار شمع دار قرار داده و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت درانکوباتور ۳۵ °C قرار گیرد

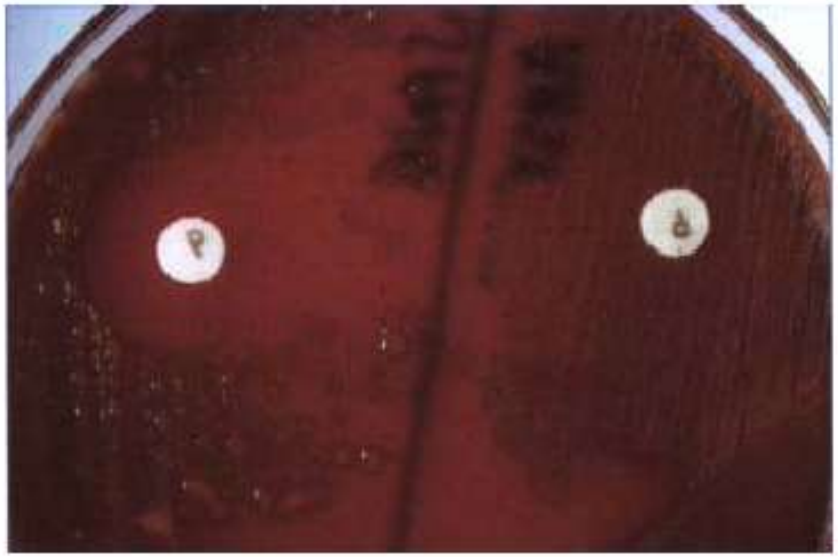
ه- تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی و در صورت تشکیل هاله عدم رشد قطر آن را اندازه گیری شود

و- نتایج به صورت حساس (قطر هاله عدم رشد برابر و یا بیستر از ۱۴ میلی متر) و مقاوم (قطر هاله عدم رشد کمتر از ۱۴ میلی متر) گزارش شود

fppt.com

تفسیر تست: پنوموکوک به اپتوکین حساس و استرپتوکوکوس های گروه ویریدانس به آن مقاوم مـ

باشند (شکل ۵-۶).



شکل ۵-۶. تست حساسیت به اپتوشین.

fppt.com

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

fppt.com