دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب

شناسایی میکروارگانیسم ها، صفات فیزیولوژیکی

شناسایی باکتری‌های شیمیوهتروتروف هوازی یا بی‌هوازی اختیاری

- کشت و شناسایی پاتوژن‌های اختصاصی از نمونه‌های جمع‌آوری شده بیماران مشکوک به عفونت هنوز هم از مطمئن‌ترین روش‌های تشخیصی است، حتی اگر سریعترین نباشد و تا زمانی که تکنیک‌های بیولوژی به نقطه‌ای از پیشرفت برسند که به راحتی بتوان توسط شاخص‌های ژنتیکی عوامل عفونی را شناسایی نمود.تشخیص قطعی عوامل عفونی بر اساس جداسازی آن‌ها استوار خواهد بود.

الف) جداسازی و خالص سازی:

- ابتدا باید باکتری را از مواد طبیعی (آب، خاک و هوا) و یا مایعات کلینیکی (چرک گوش، آبسه، خون، ادرار و مدفوع) جدا کنیم. به این منظور نمونه را روی محیط کشت‌های مورد نظر کشت می‌دهیم.

ب) شناسایی مقدماتی کلنی‌هایی که بر روی محیط جامد رشد کرده‌اند:

- از آنجایی که بیشتر نمونه‌های بالینی برروی یا در داخل چندین محیط مانند آگارهای انتخابی یا افتراقی تلقیح می‌شوند، اولین کلید در شناسایی یک کلنی ایزوله شده، طبیعت محیطی است که کلنی برروی آن رشد نموده است. مثلاً با استثنائات نادر مانند انتروکوک، فقط باکتری‌های گرم منفی به خوبی می‌توانند بر روی محیط مک کانکی آگار و سایر آگارهایی که دارای مواد که دارای مواد مهارکننده رشد باکتری‌های گرم منفی هستند،رشد کنند. سپس باید به مشخصات کلنی، همولیز و پیگمان کلنی‌های ایزوله توجه نمود.
- معقولانه نیست که تمام تلاش خود را بر روی شناسایی مرفولوژی کلنی جهت شناسایی باکتری ایزوله شده معطوف نماییم. چون ممکن است کلنی یک میکروارگانیسم از یک گونه شبیه گونه دیگری باشد.

ج) مطالعه میکروسکوپی و تعیین مرفولوژی باکتری‌ها در رنگ آمیزی:

- جهت به دست آوردن اطلاعات مرفولوژیک با ارزش میکروب شناسی باید از مواد گرفته شده از کلنی‌های ایزوله رنگ آمیزی گرم، اسید فاست و اسپور را انجام دهند.
- **د) آزمایشات بسیار سریع آنزیمی و بیوشیمیایی که می‌توان بر روی کلنی رشد نموده بر روی محیط اولیه انجام داد:**
- تمام آزمایشات این بخش را می‌توان برروی کلنی مجزا شده برروی محیط اولیه انجام داد. تمام آن‌ها در کمتر از یک ساعت واکنش مثبت ایجاد کرده و کمتر از یک یا دو دقیقه وقت گیر هستند، گرچه جزئی از آن‌ها احتیاج به انکوباسیون تا چهار ساعت ممکن است داشته باشند. چنین آزمایشاتی به تکنولوژیست کمک می‌کند که یک باکتری ایزوله شده با مرفولوژی مشخص را در تقسیم‌بندی‌های بعدی قرار دهد. این آزمایشات عبارتند از:
- کاتالاز، کوآگولاز روی لام، اکسیداز، اندول نقطه‌ای، حلالیت در صفرا، آزمایش PYR (هیدرولیز ال-پیرانیدونیل- بتا- نفتیل آمید)، اوره‌آز سریع، ترمونوکلئاز سریع، هیدرولیز هیپورات سریع

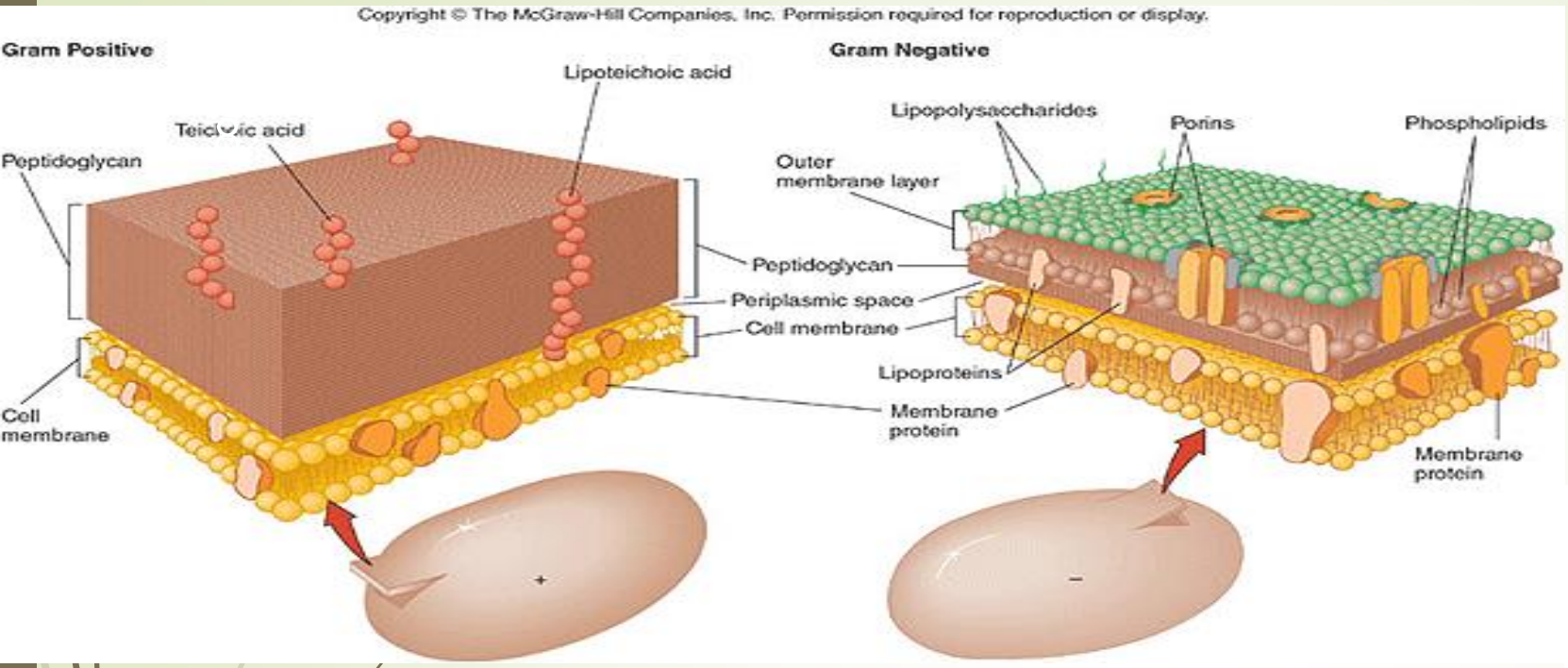
ه) آزمایشات متابولیکی و بیوشیمیایی مرسوم:

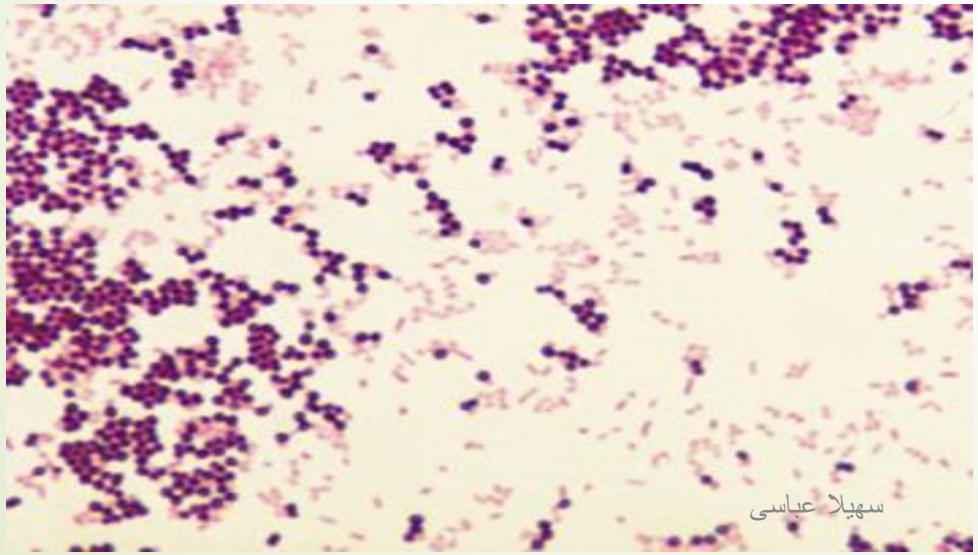
- قسمت بسیار کمی از کل ساختمان ژنتیکی باکتری‌ها مسئول تولید آنزیم‌های متابولیزه کننده می‌باشد. این آنزیم‌ها به طور معمول به عنوان یک شاخص جهت جداسازی گونه‌ها در گروه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اگر ارگانیسمی دارای آنزیمی بوده که قادر به استفاده از یک سوبسترا باشد، محصول نهایی تشکیل شده رنگ معرف pH را تغییر می‌دهد. در برخی موارد توانایی ارگانیسم جهت رشد در یک محیط به وسیله افزایش کدورت‌ها یا حضور کلنی‌ها در سطح محیط مشخص می‌شود.
- این پروسه طی سال‌های اخیر در بسیاری جهات دستخوش تغییر شده است اما هنوز هم جهت شناسایی پاتوژن‌های غیر معمول و پاتوژن‌هایی که تعیین گونه آن‌ها مشکل است مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آزمایشات عبارتند از:

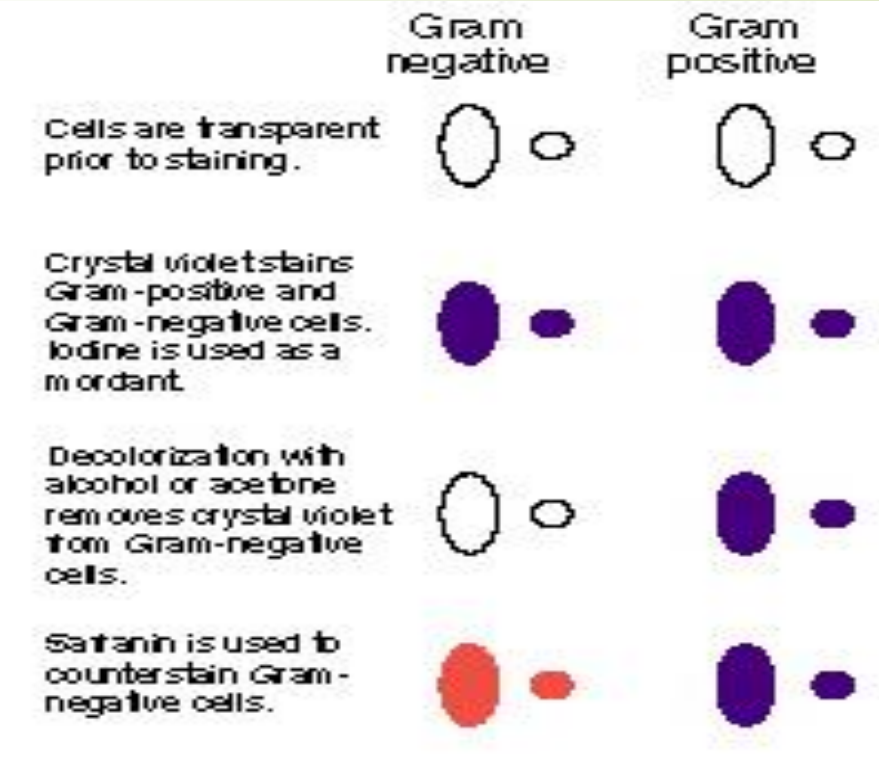
و) آزمایشات سروتایپینگ و فاژتایپینگ:

- روش انجام این آزمایشات در ترم‌های آینده آموزش داده خواهد شد.

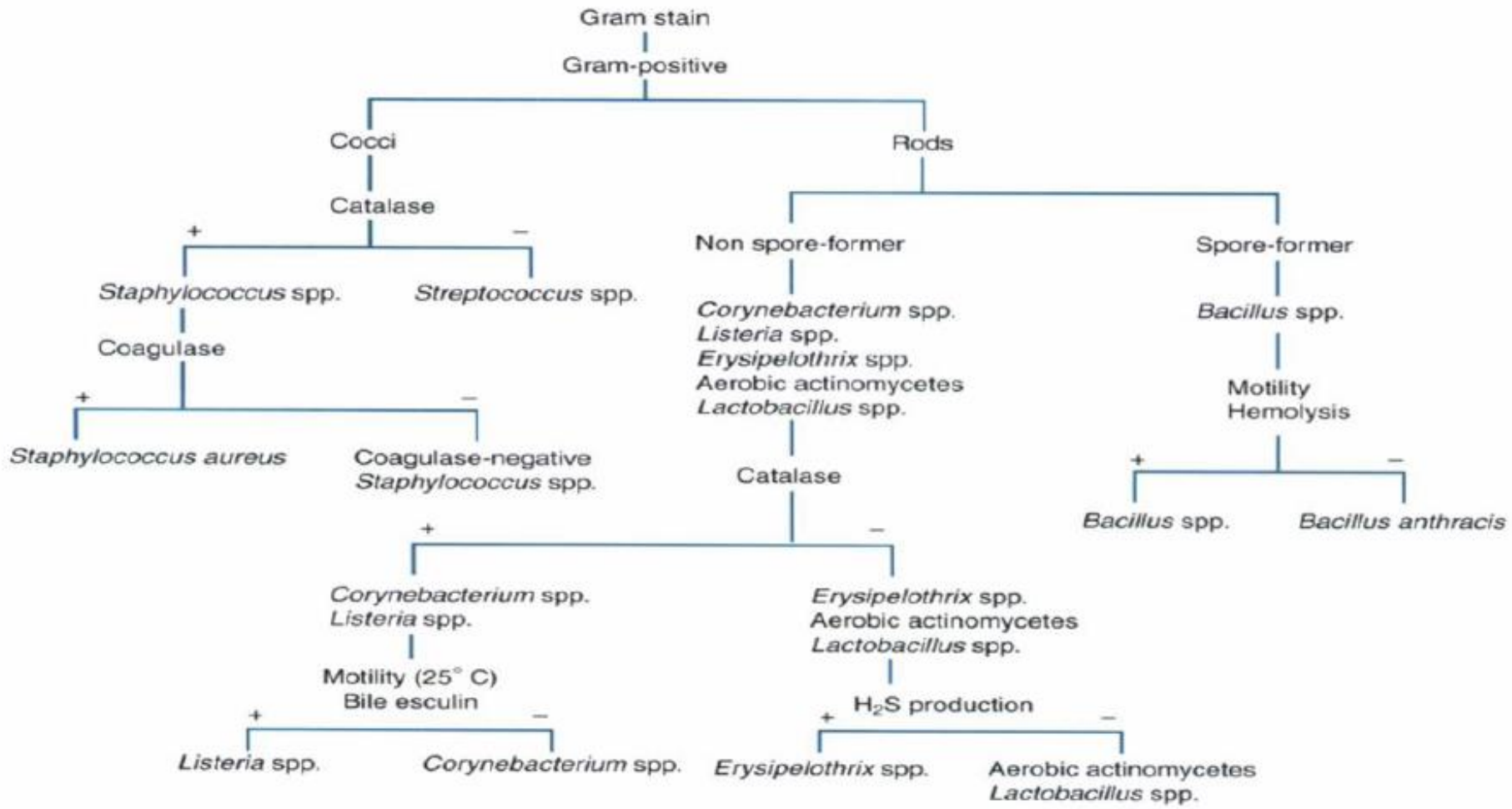
GRAM STAIN


Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.
Gram Positive
Lipoteichoic acid
Teichoic acid
Peptidoglycan
Cell membrane
Gram Negative
Lipopolysaccharides
Porins
Phospholipids
Outer membrane layer
Peptidoglycan
Periplasmic space
Cell membrane
Lipoproteins
Membrane protein
Membrane protein
+
−

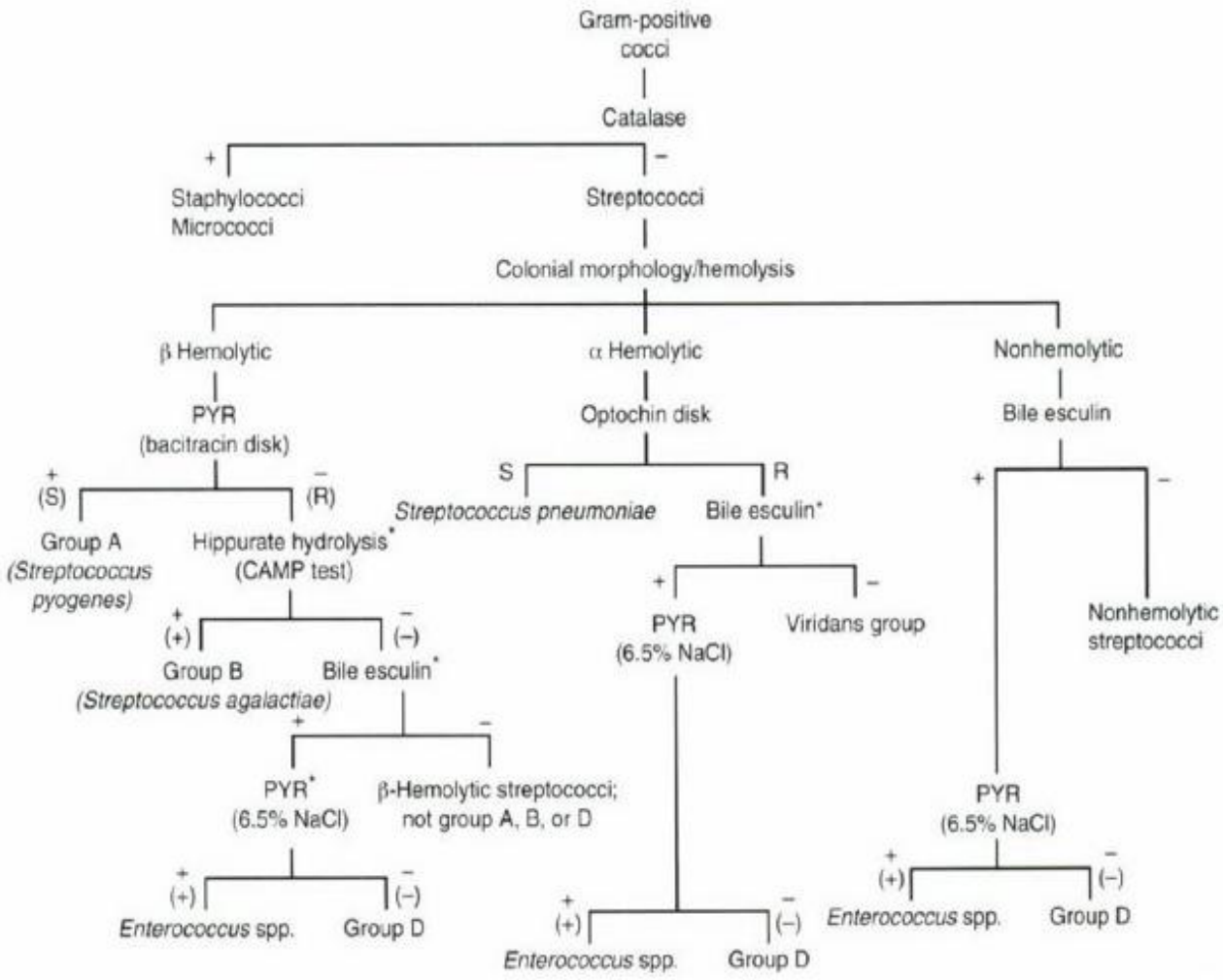



Gram negative
Gram positive
Cells are transparent prior to staining.
Crystal violet stains Gram-positive and Gram-negative cells. Iodine is used as a mordant.
Decolorization with alcohol or acetone removes crystal violet from Gram-negative cells.
Safranin is used to counterstain Gram-negative cells.

چارت شناسایی باسیل های گرم مثبت

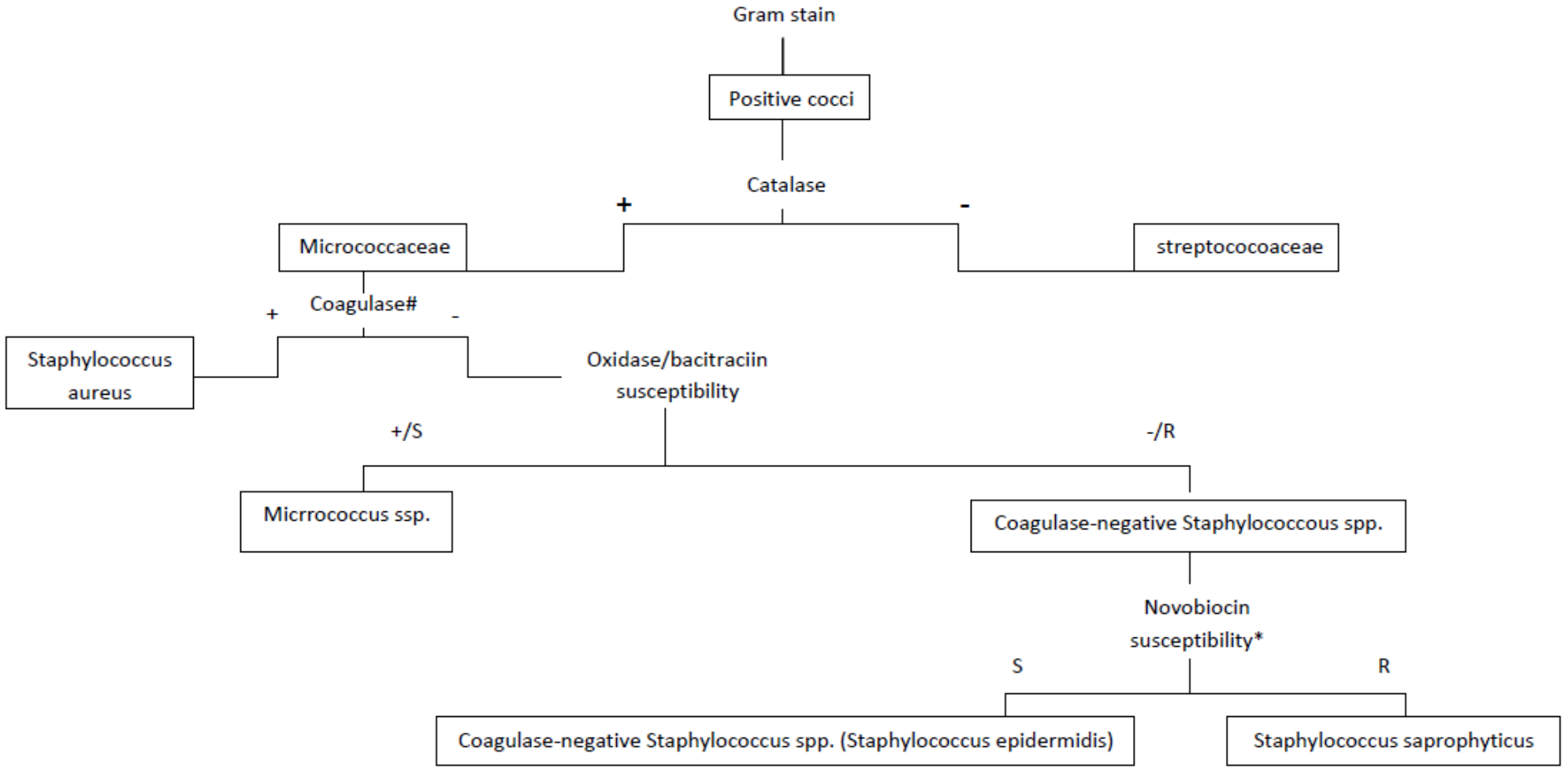


چارت شناسائی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی



*Optochin disk ≥14mm:S <9mm:R 9-13mm:Do Bile esculin

چارت شناسائی گونه های استافیلوکک



#علاوه بر S.aureus، S.lugdunensis، S.intermedius، S.schleferi و S.tryicus نیز کواگولاز مثبت می باشند.

Novobiocin susceptibility→ S:16mm≤*

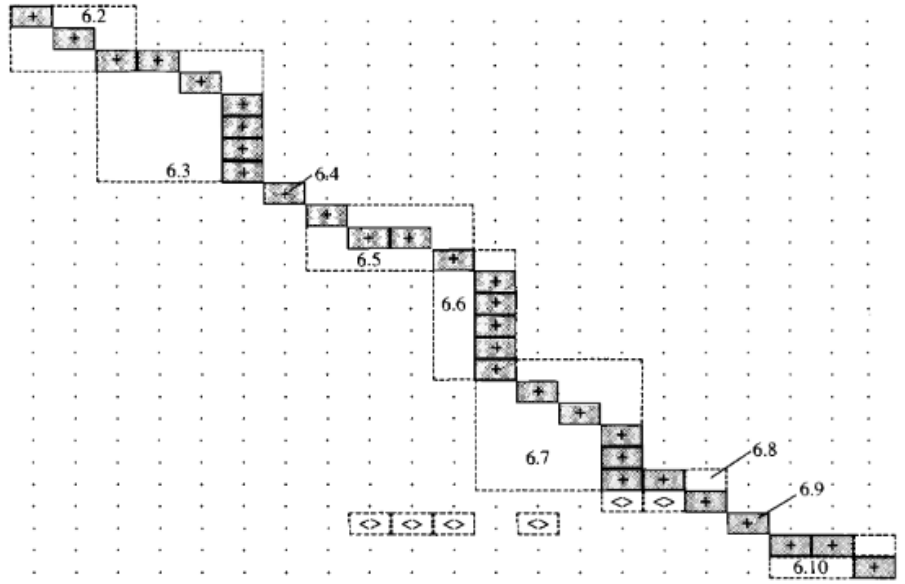
مشخصات بیوشیمیایی گونه های انتروباکتریاسه

Tests or Substrate	Escherichieae	Edwardsielleae	Citrobacteriaceae	Salmonelleae*	Klebsielleae	Proteeae†	Yersinieae
Hydrogen sulfide (TSI agar)	–	+	+ or –	+	–	+ or –	–
Urease	–	–	(+") or –	–	– or (+)	+ or –	+
Indole	+ or –	+	– or +	–	–	+ or –	+ or –
Methyl red	+	+	+	+	–	+	+
Voges-Proskauer	–	–	–	–	+	–	–
Citrate (Simmons)	–	–	+	+	+	d	–
KCN	–	–	+ or –	–	+	+	–
Phenylalanine deaminase	–	–	–	–	–	+	–
Mucate	d	–		d	+ or –	–	
Mannitol	+ or –	–	+	+	+	– or +	+

Modified from Ewing WH: *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, ed 4, East Norwalk, Conn, 1986, Appleton & Lange.
+, ≥90% positive within 1 or 2 days; (+), positive reaction after 3 or more days (decarboxylase tests: 3 or 4 days); –, ≥90% no reaction in 30 days; + *or* –, most cultures positive, some strains negative; – *or* +, most strains negative, some cultures positive; *d*, different reactions, +, (+), –; +", weakly positive reaction *TSI*, triple sugar iron; *KCN*, potassium cyanide.
**Salmonella* serovar Typhi and Paratyhpi and some rare serovars fail to use citrate in Simmons medium. Cultures of serovar Paratyhpi and some rare serotypes may fail to produce hydrogen sulfide; an occasional strain of almost serotype of *Salmonella* genus may be hydrogen sulfide negative.
†Some cultures of *Proteus mirabilis* may yield positive Voges-Proskauer tests.

Table 6.1. *First-stage table for Gram-positive bacteria*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Shape	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acid fast	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	w	+
Spores	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Motility	–	–	–	–	D	–	–	d	–	–	+	–	–	–	–	–	D	D	–	–	–
Growth in air	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	–	–	d	+	+	+	+
Growth anaerobically†	–	+	w	w	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	D	–	–	?
Catalase	+	+	w	–	–	–	–	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	+	+	+	+
Oxidase	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	?	?	?	?	?	d	–	–	–
Glucose (acid)	D	+	+	+	+	+	+/–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	D	D	+	+	+
Carbohydrates [F/O/–]	O/–	F	F	F	F	F	F/–	–	–	F	F/–	F	F	F	F	–	F/–	F/O/–	O	O	O/NT



* *Peptococcus* and *Peptostreptococcus*.
a Also *Stomatococcus*.
b Also *Leuconostoc*.
c Also *Actinomyces odontolyticus*.
d Exceptions: *C. histolyticum*; *C. tertium*; *C. carnis*.
e Also *Actinomadura*.
† Anaerobic growth of anaerobes inhibited by metronidazole.
D Different reactions in different species of the genus.
d Different reactions in different strains.
F Fermentation.
O Oxidation.
w Weak reaction.
? Not known.
◇ Asporogenous variants.
+ Typical form.

Cultural characters of these organisms can be found in tables with the number indicated.
S Sphere (coccus).
R Rod-shaped (bacillus).
NT Not testable.

Table 6.2*b*. *Third-stage table for* Staphylococcus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Growth anaerobically	+	+	+	+	+	w	w	+[a]	+	w	+	+	w	w	w	+	+	w	–	–	w	–	–	w	+	+
Oxidase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	w	+	–	–
*VP	+	–	–	–	+	+	d	?	+	+	+	–	+	+	–	+	+	–	–	–	–	d	–	–	+	+
*Coagulase	+	+	d	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Acid from																										
Lactose	+	+	+	+	D	–	–	–	D	+	–	+	+	–	+	+	d	+	+	+	d	d	+	–	–	–
*Maltose	+	–	–	d	+	–	d	–	+	+	d	–	+	+	+	d	–	+	+	+	+	+	d	+	+	–
Mannitol	+	+	–	d	–	+	–	–	+[b]	–	d	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	–	–
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Sucrose	+	+	+	+	+	+	d	–	+	+	+	+	+	–	+	–	–	d	+	+	+	–	+	+	+	–
*Trehalose	+	+	+	+	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+	d
Xylose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–
Cellobiose	–	–	–	–	–	–	–	?	–	–	–	–	–	–	–	–	?	?	–	–	+	–	+	+	–	–
Raffinose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	?	+	+	+	–	+	–	–	–
Mannose	+	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	d	–	–	+	+	+	–	d	+	+	–	+	d	+	+
*Phosphatase	+	+	+	+	+	–	–	?	d	–	–	w	–	+	+	+	?	?	+	+	+	+	+	+	–	+
Nitrate	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+
*Arginine	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+[d]	+[d]	+	d	–	–	+	?	?	–	–	?	–	?	?	–[c]	+
Urea	d	+	+	+	+	–	–	?	–	+	+	+	+	d	+	+	–	?	–	+	+	–	d	–	?	–
Protease	+	D	+	+	w	w	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	w	+	?	?
*Novobiocin	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	r	r	r	s	s	s	r	r	r	r	r	r	s	s

1 Staphylococcus aureus; *S. pyogenes; Micrococcus pyogenes* var. *aureus*
2 Staphylococcus intermedius
3 Staphylococcus hyicus
4 Staphylococcus chromogenes
5 Staphylococcus epidermidis; *Staphylococcus saprophyticus; S. albus; Micrococcus pyogenes* var. *albus*
6 Staphylococcus capitis
7 Staphylococcus auricularis
8 Staphylococcus saccharolyticus
9 Staphylococcus haemolyticus
10 Staphylococcus hominis
11 Staphylococcus warneri
12 Staphylococcus simulans
13 Staphylococcus saprophyticus
14 Staphylococcus cohnii
15 Staphylococcus xylosus
16 Staphylococcus caprae
17 Staphylococcus carnosus
18 Staphylococcus caseolyticus
19 Staphylococcus arlettae
20 Staphylococcus equorum
21 Staphylococcus gallinarum
22 Staphylococcus kloosii
23 Staphylococcus lentus
24 Staphylococcus sciuri
25 Staphylococcus lugdunensis
26 Staphylococcus schleiferi

a No growth anaerobically
b Usual reaction
c Ornithine decarboxylated
d Inferred reaction
* These tests are usually sufficient to identify the species that may infect man

s = sensitive
r = resistant

Other symbols used in the table are explained in Tables 5.1 and 5.2 on p. 47.

با تشکر از حسن توجه شما