Standard Operating Procedure (SOP)

روشهای انجام آزمایشات تشخیصی میکروب شناسی :

۱ - تهیه لام مرطوب :

بر روی لام تمیزی یک قطره سرم فیزیولوژی استریل ریخته و یک کلنی میکروبی را در آن حل می کنیم . برداشت از محیط میکروبی مایع نیاز به سرم فیزیولوژی ندارد . برداشت مستقیم از اعضاء بدن با سوآپ , مستقیما در قطره سرم فیزیولوژی حل میگردد . بر روی نمونه لامل قرار داده و زیر میکروسکوپ بررسی می کنیم .

باکتری ها بصورت دانه دانه و یا میله ای دیده میشود . علاوه بر این میتوان بحرکت باکتریها نیز پی برد . باکتریهای متحرک دارای حرک مشخص و در تمام جهات میباشند و کاملا تغییر محل میدهند و نباید با حرکت نوسانی اشتباه شود .

۲ - تهیه لام رنگ آمیزی شده [بلودومتیلن]

تهیه لام مرطوب از نمونه لام مرطوب تهیه کرده , و میگذاریم تا در حرارت اطاق خشک شود (هیچگاه نمونه را بر روی شعله خشک نکنید , باعث تخریب باکتری و یا پخش باکتری در فضا و آلودگی محیط میگردد) .

فیکس کردن نمونه را ۳ تا ۴ بار بر روی شعله حرکت داده و با تماس لام با پشت دست مقدار حرارت داده شده را که حدود ۷۰ درجه باید باشد , چک می کنیم .

رنگ آمیزی بر روی لام رنگ بلودومتیلن را ریخته و بعد از ۲ دقیقه , آهسته با آب می شوییم و می گذاریم در حرارت اتاق خشک شود . سپس با عدسی ۱۰۰ , پس از ریختن روغن صدر , باکتریها و سایر مواد را به رنگ آبی مشاهده خواهیم کرد .

۳ - تهیه لام رنگ آمیزی شده [گرم]

محلول ریوله دوژانسین : 1 gr ویوله دوژانسین + الکل 10 ml + محلول 2% فنل 100 ml

محلول لوگل : ید 1 gr + یدور پتاسیم 2 gr + آب مقطر 100 ml

محلول بیرنگ کننده : الکل 95 درجه , یا استن خالص , یا مخلوط دو قسمت الکل با یک قسمت استن مصرف میگردد.

محلول سافرانین 0.5 % و یا فوشین فنیکه رقیق:فوشین 1 gr + الکل 100 ml + محلول فنل 5 % معادل 100ml

A – بعد از فیکس کردن لام , بر روی آن رنگ ویوله دوژانسین برای نیم تا یک دقیقه میریزیم

B – رنگ را دور ریخته , لام را با آب می شوییم .

C – روی لام را به مدت یک دقیقه با لوگل می پوشانیم .

D – پس از خالی کردن لام از لوگل , چند قطره الکل روی آن میریزیم , بعد از چند ثانیه روی آن را خالی کرده مجددا الکل اضافه می کنیم این عمل را تا زمانیکه دیگر الکل رنگی نشود ادامه می دهیم .

E – لام را با آب شسته و برای مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه روی آن فوشین و یا سافرانین می ریزیم

F – رنگ را خالی کرده و لام را با آب می شوییم , و در مجاورت هوا خشک می کنیم .

لام رنگ شده را با عدسی ۱۰۰ بررسی کرده باکتری های گرم منفی قرمز رنگ , و گرم مثبت ها بنفش دیده می شوند .
با اضافه کردن الکل رنگ از درون باکتریهای گرم منفی خارج می شود و بی رنگ می گردند در صورتیکه نمی تواند رنگ را از باکتریهای گرم مثبت خارج کند .

۴ - رنگ آمیزی زیل نیلسن Ziehl - Neelsen :

مقاومت در برابر اسید در باکتریهایی مثل باسیل مایکوباکتریوم توبرکولوز ناشی از پوشش مومی است که این باکتری دارد که در اثر واکنش اسیدی رنگ قرمز فوشین جذب شده , آزاد نمی گردد .
در این رنگ آمیزی از فوشین فنیکه گرم و غلیظ برای رنگ کردن باسیل کخ استفاده می شود .
نمونه مورد آزمایش می تواند خلط – رسوب ادرار – مایعات بدن و شیره معده ... باشد
A – گسترش تهیه شده را با حرارت فیکس می کنیم .
B – محلول فوشین را روی لام پخش می کنیم و بمدت ۵ تا ۱۰ دقیقه زیر آن را توسط چراغ الکلی حرارت میدهیم بطوریکه بخار متصاعد شده ولی نجوشد . روی لام نباید خشک شود و باید بمحض تبخیر فوشین , مقداری فوشین تازه اضافه گردد .
C – لام را با آب می شوییم و روی آن محلول اسید الکل میریزیم و حدود ۲ دقیقه صبر می کنیم . تا لام بیرنگ گردد. اگر نشد این عمل را تکرار می کنیم .
D – لام را با آب می شوییم . روی آن محلول بلودومتیلن ریخته و ۱ تا ۲ دقیقه صبر می کنیم .
E – لام را با آب می شوییم . در جریان هوا آن را خشک کرده و با عدسی ۱۰۰ باسیل های اسید فست (BK) را به رنگ قرمز در زمینه آبی اسمیر جستجو می کنیم .

۵ - آزمایش کواگولاز Coagulase Test

A – روش لوله ای (کوآگولاز آزاد):
این آنزیم از اکثر استافیلوکک های بیماریزا ترشح میشود که میتواند پلاسمای انسان و خرگوش را در اثر تبدیل فیبرینوژن به فیبرین در مدت ۱ تا ۴ ساعت در ۳۷ درجه منعقد نماید .
۰/۵ میلی لیتر از پلاسمای (یک /پنجم) رقیق شده را در لوله ای ریخته و به آن یک کلنی میکروبی اضافه می کنیم . لوله را به مدت یک تا چهار ساعت در ۳۷ درجه قرار می دهیم .
نتیجه مثبت : وجود انعقاد و لخته در لوله (مشخص کننده استافیلوکوک ائوروس)
نتیجه منفی : عدم وجود انعقاد و لخته در لوله
اگر بعد از ۴ ساعت لخته تشکیل نشد باید تا ۲۴ ساعت صبر کرد و مجددا بررسی کرد .

B – روش لام (کواگولاز پیوسته) :
یک قطره سرم فیزیولوژی روی لام ریخته و یک تا دو کلنی باکتری را در آن حل می کنیم , سپس یک قطره پلاسمای خالص روی آن ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه حرکت دورانی می دهیم .
نتیجه مثبت : وجود آگلوتیناسیون در مدت ۲ دقیقه
نتیجه منفی : عدم وجود آگلوتیناسیون
در صورت مشکوک بودن باید با روش لوله ای تایید شود .

۶ - آزمایش کاتالاز Catalase

کاتالاز آنزیمی است که در تمام باکتری هایی که متابولیسم هوازی دارند وجود دارد . این آنزیم پراکسید هیدروژن (H2O2) را به هیدروژن و پراکسید تجزیه می کند .
بر روی یک لام یک قطره محلول آب اکسیژنه ۳% می ریزیم . یک کلنی باکتری را در آن

حل می کنیم .

نتیجه مثبت : از قطره روی لام حباب گاز متصاعد می گردد (باکتریهای هوازی – انتروباکتریاسه ها - استا فیلوکوک ها ...)
نتیجه منفی : عدم وجود تصاعد گاز (باکتریهای بی هوازی – لاکتوباکتریاسه ها - استرپتوکوک ها و غیره ...)
بعلت وجود آنزیم کاتالاز در گلبول های قرمز , هنگام برداشتن کلنی از محیط بلاد آگار باید مواظب بود از روی کلنی برداشت کرد .

۷- آزمایش اکسیداز Oxidase Test

این تست برای جستجو وتشخیص گونه های نیسریا و نیز تفکیک انتروباکتریاسه از پسودوموناسها , الکالیژنس , ویبریو , ائرومونـاس , مورکسلا و پاستورلا بکار می رود .
A – یک قطعه کاغذ صافی آغشته به Tetramethyl-P-Phenylenediamine Hcl را در یک پلیت قرار داده و یک کلنی از باکتری را روی آن می مالیم .
B – می توان از دیسک های کاغذی آماده آغشته به این ماده استفاده کرد و آن را روی محیط کشت قرار داد .
C – میتوان یک قطره معرف اکسیداز را روی کلنی ریخته , در صورت اکسیداز مثبت کلنی اول صورتی و سپس ارغوانی می شود .

نتیجه مثبت : پیدایش رنگ ارغوانی سیر در عرض ۱۰ ثانیه خواهد بود . (نیسریا ها اکسیداز مثبت هستند)
معرف فوق همیشه بایستی در آب مقطر و بطور تازه تهیه گردد .

۸- آزمایش اپتوچین Optochin

دیسک های آغشته به اپتوچین را بر روی محیط کشت قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه , قطر هاله توقف باکتری در اطراف دیسک را بررسی می کنیم .

نتیجه مثبت : قطر هاله ۱۸ میلیمتر یا بیشتر (پنوموکک)
نتیجه منفی : عدم وجود هاله (سایر استرپتوکوک ها)

۹- آزمایش باسیتراسین

۹۵ % از استرپتوککهای گروه A نسبت به دیسک باسیتراسین که حاوی 0.04 واحد دارو باشد حساسیت نشان میدهد در صورتیکه سایر استرپتوککها نسبت به آن مقاومت دارند.
دیسک های آغشته به باسیتراسین را بر روی محیط کشت قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه , قطر هاله توقف باکتری در اطراف دیسک را بررسی می کنیم .

نتیجه مثبت : وجود هاله توقف باکتری اطراف دیسک (استرپتوکک پیوژنز گروه A)
نتیجه منفی : عدم وجود هاله (سایر استرپتوکک ها)

۱۰ - کمپ تست CAMP Test

در محیط کشت بلادآگار , کلنی باکتری مورد نظر(استرپتوکک گروه B) را عمود بر کلنی استافیلوکک طلایی , طوری کشت می دهیم که یکدیگر را تلاقی ننمایند و۲۴ ساعت در ۳۷ درجه قرار می دهیم .

نتیجه مثبت : در محل تلاقی , همولیز واضح تر به شکل پیکان دیده میشود (تشخیص استرپتوکک گروه B آگالاکتیه Sterptococcuse Agalactiae)

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.