بسم الله الرحمن الرحیم

کلاس آموزشی روش های تشخیصی در میکروب شناسی

رنگ آمیزی گرم

- **موارد کاربرد رنگ آمیزی گرم:**

۱- طبقه بندی باکتریها بر اساس شکل، اندازه، مورفولوژی، آرایش سلول

۲- آزمایش کلیدی برای تشخیص احتمالی عفونت و بررسی کیفیت نمونه های بالینی

- واکنش سلول باکتری به رنگ گرم تحت تاثیر عوامل مختلفی است:

- سن کشت
- محیط کشت
- شرایط محیط انکوباسیون
- روش های رنگ آمیزی
- وجود مهارکننده

رنگ آمیزی گرم

- برای تفسیر اسمیر تهیه شده از نمونه های بالینی، عوامل دیگری مثل وجود انواع سلول های میزبان و سلول های فاگوسیتوز موثر می باشند.
- صحیح ترین نتیجه رنگ آمیزی
  - تهیه اسمیر از کشت های تازه (کمتر از ۲۴ ساعت)
  - استفاده از کلنی محیط های غیر مهارکننده
  - نمونه های بالینی تازه
- زمانی که مورفولوژی مهم است (مانندااسترپتوکوک ها و باسیل های گرم مثبت) کشت های مایع ارجحیت دارد.

رنگ آمیزی گرم

- معرف های رنگ گرم به دو روش تهیه می شود:

  - آماده مصرف تجاری
  - تهیه شده در آزمایشگاه

- در صورت تهیه معرف در حجم زیاد، برای مصرف روزانه معرف ها را در بطری های کوچک تر بریزید.

برای جلوگیری از ایجاد رسوب روی لام، بطری های کوچک تر کریستال ویوله و رنگ برها باید هر ماه جایگزین شوند.

رنگ آمیزی گرم

- ثبت مشخصات معرف روی بطری و برگه کاری
  - نام معرف
  - تاریخ استفاده
  - تاریخ انقضاء
  - تاریخ آماده سازی
  - شرایط نگهداری
- در صورتی که در برگه کاری کنترل رنگ گرم مشخصات فوق ثبت شده باشد برچسب گذاری بطری های کاری با این مشخصات، لازم نمی باشد به استثناء نام معرف

کنترل کیفی رنگ آمیزی گرم

- معرف ها از نظری ظاهری به طور روزانه بررسی کنید.
- اگر کریستال ویوله رسوب یا ته نشین کند، قبل از استفاده آن را صاف کنید.
- اگر محلول های کاری با مصرف روزانه تمام نمی شوند، باید به طور منظم (ماهیانه) عوض شوند، تبخیر مواد ممکن است عملکرد معرف ها راتغییر دهد.
- رنگ ها می توانند آلوده شوند وقتی مشکوک می شوید باید از سری ساخت جدید معرف استفاده کنید.
- آلودگی در رنگ های بازی مثل فوشین و سافرانین روی می دهد.

کنترل کیفی رنگ آمیزی گرم

- دفعات کنترل کیفیت رنگ گرم با سوش های ATCC:
- قبل از استفاده از هر سری ساخت جدید یا خرید هر رنگ و بعد از آن **حداقل هفتگی** با یک میکروارگانیسم گرم مثبت و یک میکروارگانیسم گرم منفی
- در صورتی که در آزمایشگاهی رنگ آمیزی گرم به تعداد دفعات کم انجام می شود، کنترل کیفیت رنگ به صورت روزانه با هر بار آزمایش نمونه بیمار با یک میکروارگانیسم گرم مثبت و یک میکروارگانیسم گرم منفی انجام گردد.

روش انجام کنترل کیفیت رنگ گرم

- تهیه سوسپانسیون با کدورت کم از سوش Ecoli ATCC با شماره ۲۵۹۲۲ و استافیلوکوک آرئوس با شماره ۲۵۹۲۳ در محیط براث
- محیط براث را در انکوباتور به مدت ۵-۶ ساعت قرار دهید تا باکتریها به فاز لگاریتمی رشد برسند چون در این فاز دیواره باکتری خیلی تیپیک رنگ آمیزی می شوند.
- وقتی باکتری در براث رشد کرد، دو قطره از آن را روی لام قرار دهید و اسمیر تهیه کنید.
- می توانید تعداد زیادی لام به این روش آماده نمایید و آنها را با متانول فیکس نمایید و در فریزر 20- درجه نگهداری نمایید و هر بار که خواستید کنترل کیفی رنگ آمیزی گرم انجام دهید، یکی از لام ها از فریزر خارج کنید به دمای اتاق برسانید و مطابق روش رنگ آمیزی، رنگ آمیزی انجام دهید.

روش انجام کنترل کیفیت رنگ گرم

- **نتایج مورد انتظار**:

- باسیل گرم منفی: رنگ صورتی
- کوکسی گرم مثبت: بنفش رنگ

- **روش جایگزین:**

- با یک اپلیکاتور چوبی از بین دندان ها نمونه گیری کرده و در انتهای لام نمونه بیمار قرار دهید، این روش Bult in می باشدکه سویه های گرم مثبت و منفی دیده می شود.

کنترل کیفیت رنگ گرم با سویه های ATCC

- لام رنگ آمیزی شده با سوش ATCC بررسی می شود و در صورت قابل قبول بودن نتیجه نهایی اطلاعات ثبت می شود در غیر این صورت اقدامات اصلاحی انجام می گردد ودر نهایت نتایج کنترل کیفیت رنگ آمیزی گرم در آزمایشگاه باید در فرم های مربوطه ثبت و نگهداری گردد.

- **مواردی که در فرم ها باید ثبت شود:**

- نام فرد انجام دهنده
- تاریخ انجام آزمایش
- نتایج آزمایش با سویه های ATCC
- اقدام اصلاحی انجام شده
- نتیجه نهایی
- سری ساخت
- تاریخ انقضاء
- نام تولید کننده یا شرکت سازنده
- مشخصات فیزیکی رنگ

رنگ آمیزی گرم

- **چه مواقعی لازم است اقدام اصلاحی انجام گردد:**
  - اسمیرهای تهیه شده کیفیت خوبی نداشته باشند
  - تفسیر رنگ ها مشکل باشد
- **مشخصات رنگ آمیزی نامناسب**
  - رنگ آمیزی کمرنگ ارگانیسم های گرم مثبت
  - باقی ماندن کریستال ویوله در ارگانیسم های گرم منفی، در این حالت رنگ صورتی بنفش دیده می شود
  - رنگ گرفتن کناره های اسمیر
  - رسوب روی لام

رنگ آمیزی گرم

- **روش انجام رنگ آمیزی گرم**

۱- کریستال ویوله ۲- ید ۳- رنگ بر ۴- سافرانین

- **عواملی که باعث ایجاد نتایج نامناسب می شوند:**

- استفاده از لام های شیشه ای که خیلی تمیز نباشند
- اسمیری که خیلی ضخیم تهیه شده باشد
- حرارت دادن زیاد اسمیر، زمانی که از حرارت برای فیکس کردن استفاده شود.
- آبکشی زیاد طی انجام رنگ آمیزی به خصوص اگر اسمیر به طور صحیح فیکس نشده باشد
- وجود رسوب در معرف ها

مقایسه نتایج کشت با گزارش های رنگ آمیزی گرم

- در رنگ آمیزی گرم میکروارگانیسم هایی گزارش می شوند که آن ارگانیسم در کشت جدا نشده است.
- در رنگ آمیزی گرم هیچ میکروارگانیسمی مشاهده نشده اما در کشت میکروارگانیسم جدا شده است.
- علت عدم تطابق:

  - خطای مشاهده شده در اسمیر و تفسیر آن
  - لزوم استفاده از سایر روش های کشت مانند کشت بی هوازی و یا کشت باسیل های اسید فست

فرم ثبت اطلاعات کنترل کیفیت رنگ ها در بخش میکروب شناسی

نام رنگ	سری ساخت	تاریخ انقضاء	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ارگانیسم	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام انجام دهنده	تاریخ انجام
										هفتگی		

رنگ آمیزی زیل نلسون یا Acid Fast

- **روش انجام:**

- ابتدا از نمونه خلط گسترش تهیه نمایید. (مقداری از نمونه خلط را بر روی لام قرار دهید سپس لام دیگری را روی لام اول قرار دهید و در جهت عکس یکدیگر بکشید تا دو عدد گسترش تهیه شود.)
- لام را داخل فور در دمای ۶۰- ۷۰ درجه سانتیگراد فیکس نمایید.
- لام را روی پل رنگ آمیزی قرار دهید.
- یک عدد کاغذ صافی به ابعاد ۲ در ۶ سانتی متر را روی لام قرار دهید.
- رنگ ذیل نلسون را بر روی کاغذ صافی و گسترش بریزید.

رنگ آمیزی زیل نلسون یا Acid fast

- پنبه آغشته به الکل را با پنس برداشته با شعله روشن نموده و در زیر لام قرار دهید، این کار را برای ۵ دقیقه ادامه دهید تا رنگ حرارت دیده بخار کند.

توجه: (دقت نمایید که رنگ به جوش نیاید، زیرا سبب رسوب رنگ و عدم مشاهده صحیح نمونه خواهد شد.)

- کمی صبر کنید تا لام خنک شود و سپس لام را در ظرف اسید الکل برای مدت ۱ تا ۲ دقیقه رنگ بری نمایید.
- رنگ متیلن بلو را بر روی لام برای مدت ۱ دقیقه بریزید.
- لام را خشک نموده و با میکروسکوپ مشاهده نمایید.

کنترل کیفیت رنگ آمیزی زیل نلسون یا Acid fast

رنگ	سری ساخت	تاریخ انقضاء	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ارگانی سم	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهد ه شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایشات	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
Acid fast (Ziehl-Neelsen)				مایکوباکتریوم توبرکلوزیز (کنترل مثبتBCG)	25177	باسیل صورتی قرمز				هر سری ساخت و سپس هر روز کاری		
				Ecoli (کنترل منفی)	25922	باسیل آبی						
				سرم فیزیولوژی		عدم مشاهده باکتری						

رنگ آمیزی متیلن بلو

رنگ	سری ساخت	تاریخ انقضاء	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ارگانی سم	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهد ه شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایشات	نام انجام دهنده	تاریخ انجام
Methyle ne Blue				کورینه باکتریوم SPP	-	باسیل های پلی مورف آبی با دانه های متاکروماتیک				هر سری ساخت و سپس هر ماه		
				Ecoli	25922	باسیل آبی						
				سرم فیزیولوزی		عدم مشاهده باکتری						

تست اکسیداز

- **هدف آزمایش:**

➢ تست تشخیصی مهم برای تشخیص باکتری های میله ای که عضو خانواده انتروباکتریاسه ها نیستند.

➢ افتراق انتروباکتریاسه ها (اکسیداز منفی از گونه های آئروموناس، پلزیوموناس شیگلوئیدس و اکثر گونه های ویبریو (اکسیداز مثبت)

➢ افتراق موراکسلا و نایسریا (اکسیداز مثبت) از اسینتوباکتر (اکسیداز منفی)

➢ گونه های کمپیلوباکتر اکسیداز مثبت هستند.

- **اساس آزمایش:**

➢ آنزیم باکتریایی داخل سلولی سیتوکروم اکسیداز در حضور اکسیژن محیط، معرف متیلن دی آمین (پذیرنده الکترون) را به فنل اندول (اندوفنل) بنفش تیره اکسید می کند.

✓ برای تشخیص اولیه باکتری های گرم منفی مفید است.

معرف های مورد استفاده در تست اکسیداز

- معرف کواکس اکسیداز (تترا متیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید) به صورت محلول استفاده می شود.
- دیسک های یا نوارهای آغشته به معرف (آماده مصرف تجاری)

روش ساخت معرف کواکس

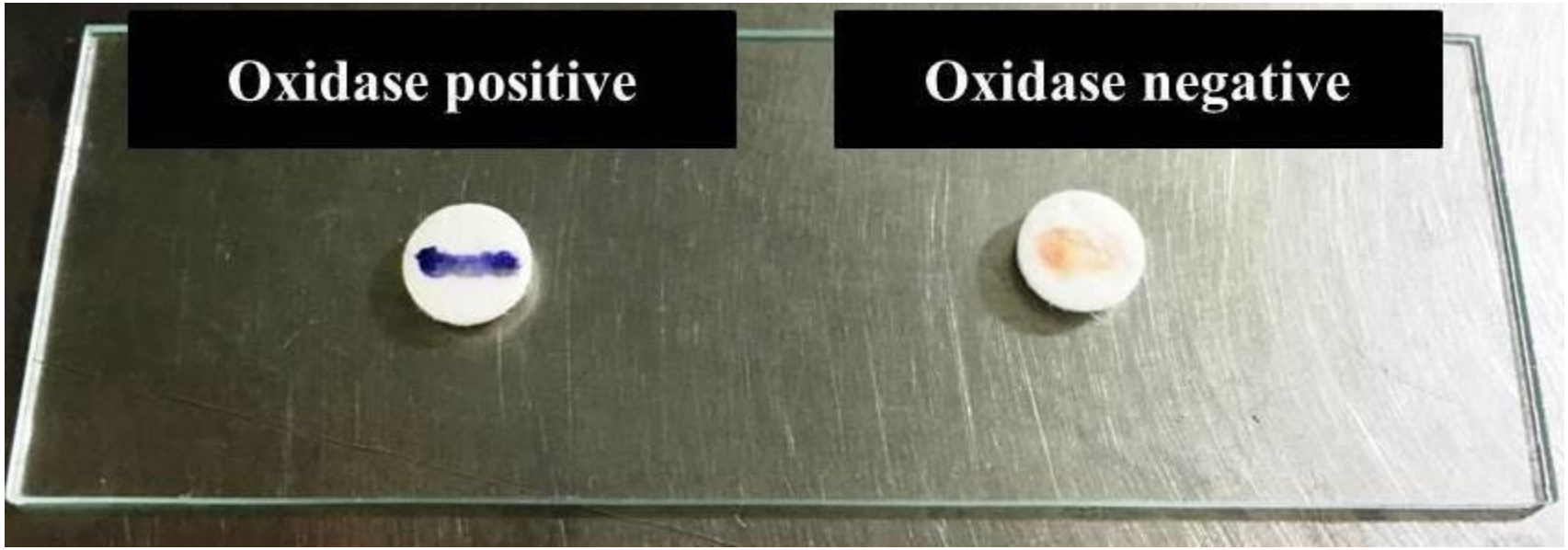
- برای تهیه محلول ۱٪ اکسیداز، ۰.۱ گرم از پودر تترا متیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید را در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کنید، مخلوط نمایید و به مدت ۱۵ دقیقه آن را در جای ثابت قرار دهید.
- معرف ها را روزانه تهیه نمایید همچنین می توانید معرف ها را در لوله های پوشیده شده با فویل تقسیم کرده و در دمای 20- درجه سانتیگراد ذخیره نمایید و قبل از استفاده معرف را از فریزر خارج نموده، ذوب شود و باقیمانده را هر روز دور بریزید.
- فرمول های دیگری نیز وجود دارد اما کواکس حساس ترین معرف است و پایدار بوده و نسبت به مشتق دی متیل آن کمتر سمی است.

روش انجام آزمایش اکسیداز

- مربع کوچکی از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ را در ظرف پتری دیش قرار دهید و با ۱ یا ۲ قطره از معرف کواکس اکسیداز آماده شده، مرطوب نمایید.
- دیسک اکسیداز آماده مصرف را در ظرف پتری دیش قرار دهید.
- هنگام استفاده از دیسک مطابق دستورالعمل همراه آن عمل نمایید، ممکن است مطابق دستورالعمل بعضی سازندگان نیاز به مرطوب کردن دیسک باشد.
- یک کلنی تک از با استفاده از اپلیکاتور برداشته و بر روی کاغذ صافی آغشته به معرف اکسیداز یا دیسک پخش کنید و تغییر رنگ محل تلقیح را مشاهده کنید.
- برای باکتری های سخت رشد یا پرنیاز کلنی را با سوآپ پنبه ای سفید بردارید. باکتری سخت رشد مثل هموفیلوس ها

تفسیر آزمایش اکسیداز

- واکنش مثبت: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۱۰ ثانیه
- واکنش تاخیری: ایجاد رنگ آبی تیره تا بنفش در مدت ۱۰-۶۰ ثانیه (باید تست های بیشتری انجام شود و احتمالا از خانواده انتروباکتریاسه ها نیست)
- واکنش منفی : عدم تغییر رنگ یا ایجاد رنگ صورنی کمرنگ در مدت ۱۰ ثانیه
- در خصوص تفسیر از دستورالعمل دیسک توجه فرمایید.



تست اکسیداز در لوله آزمایش:
در سمت چپ، باکتری اکسیداز مثبت *Neisseria sicca* و در سمت راست، استافیلوکوکوس آرئوس اکسیداز منفی را مشاهده می کنید. پس از ۲۴ ساعت از کشت باکتری ها، معرف گیای و هادلی به هر لوله افزوده شد.

کنترل کیفیت تست اکسیداز

- هر سری ساخت معرف یا خرید دیسک آماده مصرف تجاری و سپس هر روز کاری (هر روزی که برای سویه های جدا شده از بیمار بخواهید تست اکسیداز انجام دهید.)
- هنگامی که محلول معرف به رنگ بنفش کم رنگ تغییر کند یا دیسک کاغذی در حال تیره شدن است، از آن استفاده نکنید چون معرف اکسید شده است.
- **کنترل مثبت**: سوش ATCC پسودوموناس آئروژینوزا شماره ۲۷۸۵۳
- **کنترل منفی** : سوش Esherichia Coli ATCC شماره ۲۵۹۲۲

فرم ثبت نتیجه کنترل کیفیت معرف اکسیداز

نام معرف	سری ساخت	تاریخ انقضاء	تولید کننده یا شرکت سازنده	مشخصات فیزیکی	ارگانیسم کنترل	شماره ارگانیسم	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی	تعداد دفعات انجام	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش
تست اکسیداز													

محدودیت های انجام تست اکسیداز

- **برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب :**

- از لوپ استریل نیکروم برای برداشتن کلنی استفاده نکنید زیرا در اثر استریل کردن لوپ با شعله، اکسیداسیون سطحی ایجاد شده و نتیجه مثبت کاذب بدست می آید.
- از ارگانیسم هایی که روی محیط های گلوکز یا رنگ مانند MAC یا EMB رشد کرده اند استفاده نکنید.
- اگر معرف تغییر رنگ داده استفاده نکنید.
- رعایت زمان قرائت واکنش برای انجام دقیق تست بسیار مهم است.

تست کاتالاز

- **هدف آزمایش:**

- افتراق استافیلوکوک و میکروکوک ها (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک ها و انتروکوک ها (کاتالاز منفی)
- افتراق کلستریدیوم ها (کاتالاز منفی) از باسیلوس ها (کاتالاز مثبت)
- افتراق لیستریا مونوسیتوژن و کورینه باکتریوم ها (کاتالاز مثبت) از استرپتوکوک های گروه B (کاتالاز منفی)
- افتراق باسیل های گرم منفی سخت رشد از یکدیگر

اصول تست کاتالاز

- **اساس آزمایش:**

➢ آنزیم کاتالاز موجود در باکتری، پرکسیداز هیدروژن را به آب و اکسیژن هیدرولیز می کند و منجر به آزاد شدن حباب های گاز می شود.

➢ H_2O_2 یکی از محصولات نهایی اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات است.

➢ این آزمایش در تشخیص اولیه اغلب باکتری ها مفید واقع می شود.

➢ **نمونه ای که برای آزمایش کاتالاز استفاده می شود باید خصوصیات زیر را داشته باشد:**

- کلنی های خالص و تازه(کشت ۲۴ تا ۱۸ ساعت) از باکتری رشد یافته بر روی محیط آگار مناسب
- برای باکتری های بی هوازی کلنی ها را به مدت ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش در معرض هوا قرار دهید.

معرف ها و ابزار تست کاتالاز

- معرف پراکسید هیدروژن ۳۰٪ برای نایسریا ها (هشدار آب اکسیژنه ۳۰٪ به شدت برای پوست سوزاننده است در صورت تماس با پوست فورا با اتیل الکل ۷۰٪ و نه آب شستشو دهید)
- معرف پراکسید هیدروژن ۱۵٪ برای میکروارگانیسم های بی هوازی
- معرف پراکسید هیدروژن ۳٪ برای سایر باکتری ها

توجه: معرف ۳۰٪ را می توان برای تمام آزمون ها استفاده کرد ولی خطرناک است.

- معرف ها باید در شیشه های تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شوند.
- اپلیکاتور چوبی یا شیشه ای یا لوپ پلاتینی
- لام شیشه ای

روش انجام آزمایش

روش انجام:

- با یک اپلیکاتور از مرکز یک کلنی ۲۴ تا ۱۸ ساعته به سطح یک لام شیشه ای تمیز منتقل کنید، اطمینان حاصل کنید که کلنی روی لام با چشم قابل رویت است .
- اگر برداشت کلنی از روی محیط بلاد آگار انجام می گردد، دقت نمایید از خون برداشته نشود.
- بلافاصله یک قطره از معرف را به کلنی روی لام اضافه کنید و فورا ایجاد حباب روی لام را بررسی نمایید.
- نتیجه را به صورت منفی یا مثبت گزارش دهید و برای مشاهده بهتر حباب ها، لام را روی زمینه سیاه نگهدارید.
- لام را داخل Safety Box بیندازید.

Catalase Test
Staph
+
Strep
—

تفسیر تست کاتالاز

- واکنش مثبت: ظاهر شدن فوری حباب به صورت ماندگار یا حالت جوش زدن
- واکنش ضعیف: ایجاد یک یا دو حباب
- واکنش منفی: عدم ایجاد حباب یا ظاهر شدن چند حباب بعد از ۲۰ ثانیه
- (بعضی از باکتری ها دارای آنزیمی غیر از کاتالاز هستند که پراکسید هیدروژن را تجزیه کرده که تعداد کمی حباب ایجاد می شود، آنزیم پسودوکاتالاز می باشد.)

- **دفعات کنترل کیفیت تست کاتالاز**

- هر سری ساخت و سپس هر روز کاری

سوش های مورد استفاده و تعداد دفعات کنترل کیفیت تست کاتالاز

- سویه کنترل مثبت: سوش ATCC استافیلوکوک آرئوس شماره ۲۵۹۲۳
- سویه کنترل منفی: سوش ATCC استرپتوکوک پیوژن شماره ۱۹۶۱۵
- هری سری ساخت و خرید جدید معرف پراکسید هیدروژن و سپس هر روز کاری

سوش های مورد استفاده و تعداد دفعات کنترل کیفیت تست کاتالاز

نام تست	نام معرف	سری ساخت	تاریخ انقضاء	تولید کننده یا شرکت سازنده	مشخصات فیزیکی	ارگانیسم کنترل	شماره ارگانیسم	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی	تعداد دفعات انجام	نام فرد انجام دهنده آزمایش	تاریخ انجام آزمایش
تست کاتالاز	آب اکسیژنه													

محدودیت های تست کاتالاز

- برای انجام تست کاتالاز، کلنی از محیط آگار خوندار برداشت نشود در صورت برداشت از محیط آگار خوندار از قله کلنی بدون تماس با محیط انجام گردد،
- زیرا گلبول های قرمز خون حاوی آنزیم کاتالاز هستند و نتیجه مثبت کاذب می دهند.
- از محیط مولرهینتون آگار استفاده نگردد.
- برای انجام این آزمایش بهتر است از یک اپلیکاتور چوبی، لوپ پلاتینی یا پلاستیکی برای برداشتن کلنی استفاده گردد، استفاده از لوپ آهنی واکنش مثبت کاذب ایجاد می کند.

محدودیت های تست کاتالاز

- ایجاد حباب های ریز به تعداد کم بعد از ۲۰ ثانیه مثبت در نظر گرفته نمی شود، که این حالت برای انتروکوک ها پیش می آید و علت آن وجود آنزیمی تجزیه کننده پراکسید هیدروژن به غیر از کاتالاز می باشد.
- آنزیم کاتالاز فقط در کشت های زنده وجود دارد و کشت های بیشتر از ۲۴ ساعت برای آزمایش مناسب نیستند، کشت های کهنه ممکن است سبب نتیجه منفی کاذب شوند.
- ترتیب اضافه کردن معرف به کلنی را بر عکس نکنید زیرا می تواند نتایج منفی کاذب رخ دهد.
- معرف و کلنی ها را نباید مخلوط کنید چون باعث از بین رفتن حباب می شود و تفسیر نتیجه را مشکل می کند.

تست کوآگولاز

- پلاسمای خرگوش دهیدراته حاوی ماده ضد انعقاد EDTA با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، آب اضافه نمایید.
- این معرف به مدت ۵ روز در یخچال و یک ماه در فریزر 20- درجه قابل نگهداری است.
- از پلاسمای خرگوشی که در یخچال یا فریزر نگهداری نشده است و یا کدر می باشد استفاده نکنید.

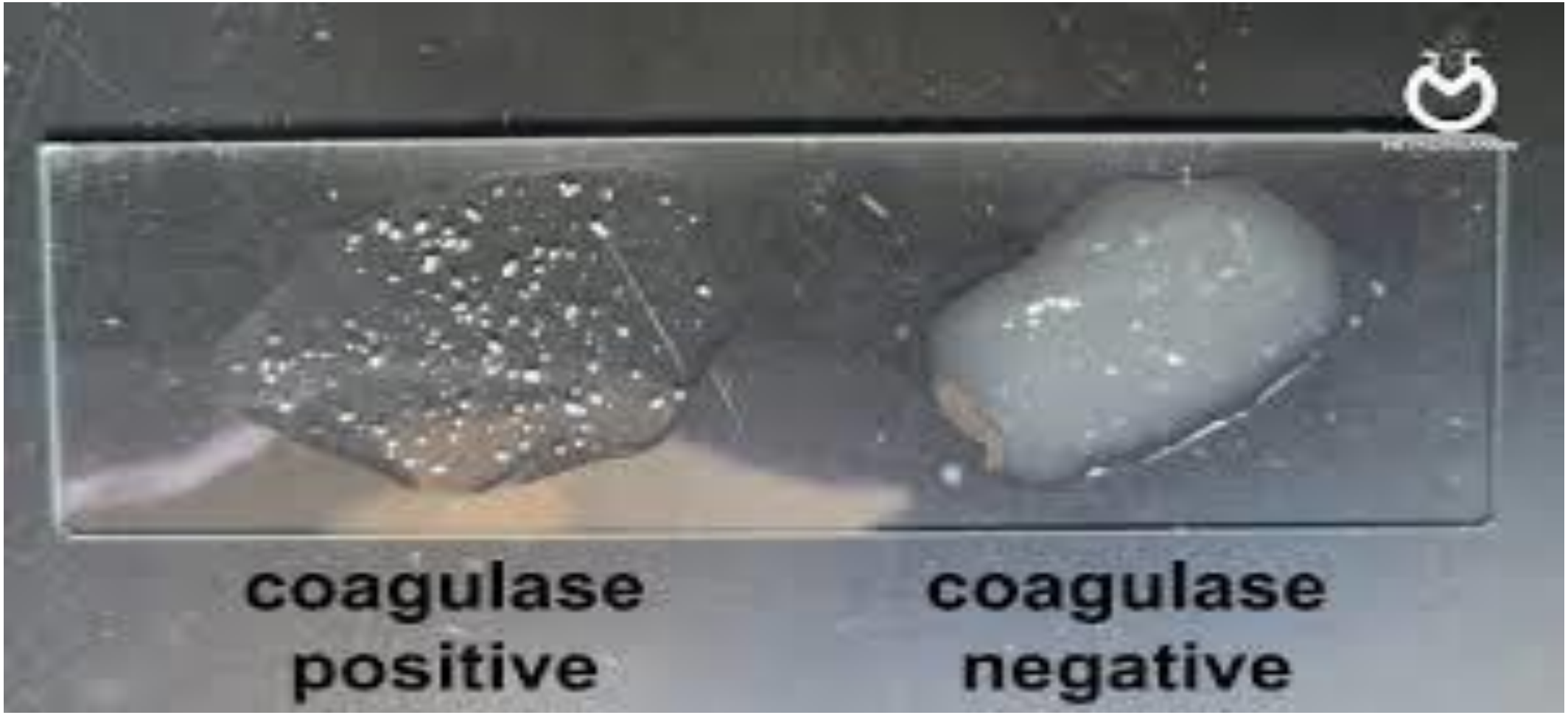
روش انجام تست کوآگولاز بر روی لام

- **انجام آزمایش کوآگولاز بر روی لام**

۱- ۱۰ µl آب مقطر استریل را در مرکز یک لام شیشه ای قرار دهید.

چند کلنی تازه از ارگانیسم مورد نظر را به صورت یکنواخت در قطره آب حل کنید تا سوسپانسیون یکنواخت شیری رنگی ایجاد شود.

۲- در مرحله بعد ۳-۱ µl پلاسمای خرگوشی EDTA دار را به سوسپانسیون اضافه کنید و بلافاصله تشکیل کلامپ را بررسی نمایید. (در واکنش مثبت حداکثر طی مدت ۱۰ ثانیه بعد از مخلوط کردن پلاسما با سوسپانسیون ذرات آگلوتیناسیون سفید رنگی در سوسپانسیون مشاهده می شود.)


coagulase
positive
coagulase
negative

تفسیر نتیجه تست کوآگولاز بر روی لام

- **نتیجه مثبت**: ظاهر شدن آگلوتیناسیون سلول های باکتری بعد از اضافه کردن پلاسما
- **نتیجه منفی** : عدم آگلوتیناسیون
- **توجه:** در صورت منفی شدن تست کوآگولاز بر روی لام، حتما با روش لوله ای تایید گردد.

روش انجام تست کوآگولاز به روش لوله ای

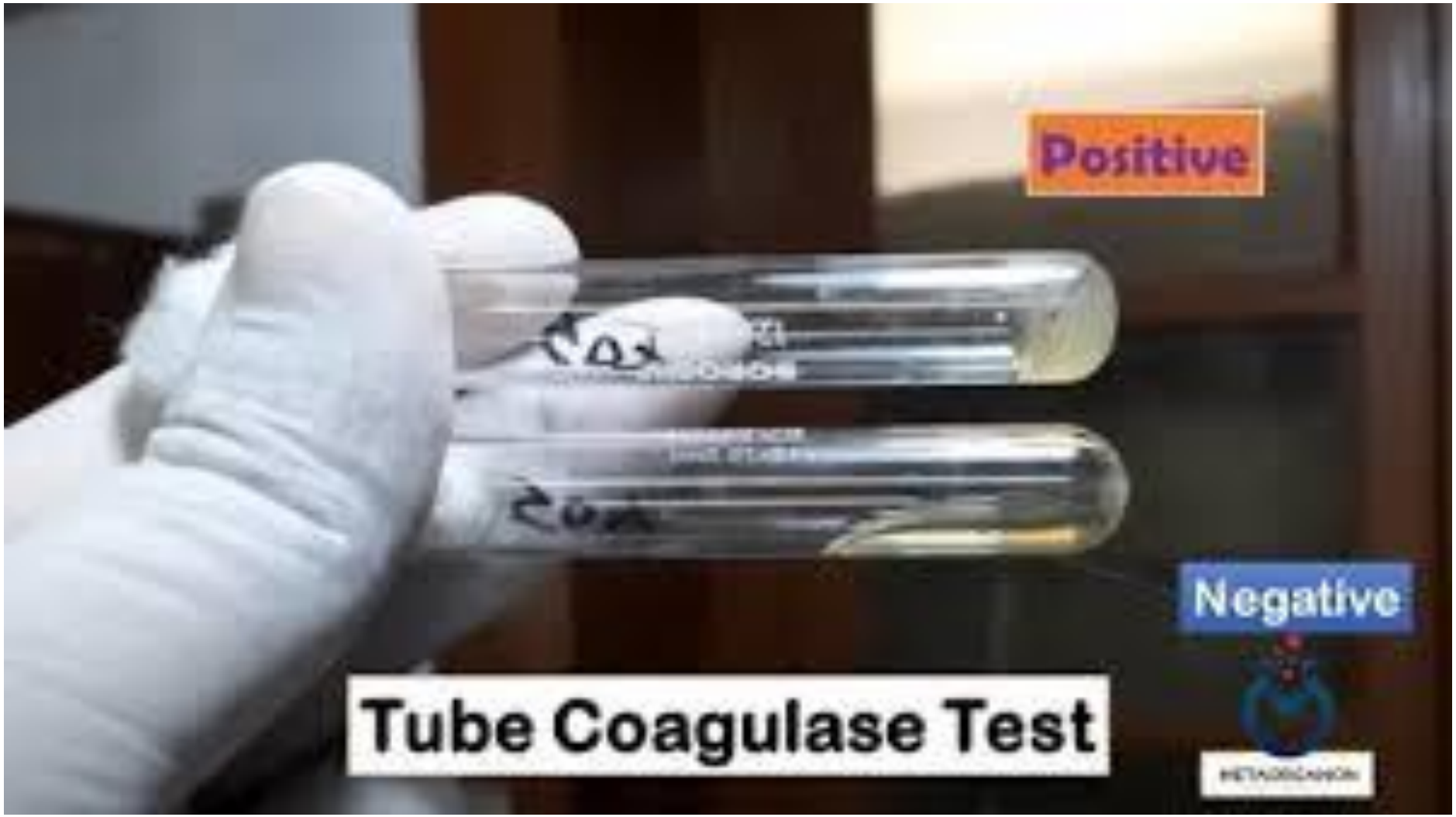
- لوله حاوی ۰.۵ میلی لیتر پلاسمای خرگوشی را به دمای 25° برسانید.
- یک کلنی از ارگانیسم رشد کرده بر روی محیط غیر مهارکننده را به لوله حاوی پلاسما اضافه نمایید.
- لوله را به مدت حداکثر ۴ ساعت در دما 35° انکوبه نمایید و هر یک ساعت یکبار لوله را از نظر ایجاد لخته بررسی نمایید لوله را در حین مشاهده تکان ندهید و برای دیدن لخته آن را به آرامی کج کنید.
- اگر لخته مشاهده نشد لوله را در دما 25° قرار داده و بعد از ۲۰ ساعت دوباره آن را بررسی نمایید.

روش انجام تست کوآگولاز به روش لوله ای

- **توجه**: لوله برای مدت بیشتر از ۴ ساعت در دمای 35° قرار ندهید زیرا فیبرینولیزین موجود در استافیلوکوک آرئوس لخته ایجاد شده را هیدرولیز می کند.
- اگر آزمایش کلا در دمای 25° انجام شود ممکن است لخته دیرتر تشکیل شود ولی آزمایش دارای حساسیت بیشتری خواهد بود.

تفسیر نتیجه تست کوآگولاز به روش لوله ای

- **نتیجه مثبت**: تشکیل لخته کامل یا هر میزان لخته قبل از ۲۴ ساعت
- **نتیجه منفی**: عدم تشکیل لخته در مدت ۲۴ ساعت
- **سویه کنترل مثبت**: سوش ATCC استافیلوکوک آرئوس شماره ۲۵۹۲۳
- **سویه کنترل منفی**: سوش ATCC استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۱۲۲۲۸
- **تعداد دفعات انجام**: هر سری ساخت و خرید جدید معرف پراکسید هیدروژن و سپس هر روز کاری


Positive
Negative
Tube Coagulase Test

انجام کنترل کیفیت تست کوآگولاز

تست تشخیصی	نام معرف	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست کوآگولاز	پلاسمای خرگوش					استافیلوکوک آرئوس (کنترل مثبت)	۲۵۹۲۳	ایجادلخته مثبت				هر سری ساخت و خرید پلاسما خرگوش سپس هر روز کاری		
تست کوآگولاز	پلاسمای خرگوش					استافیلوکوک اپیدرمیدیس (کنترل منفی)	۱۲۲۸	عدم ایجاد لخته منفی				هر سری ساخت و خرید پلاسما خرگوش سپس هر روز کاری		

بررسی همولیز

- همولیز توانایی بعضی از باکتری ها در لیز گلبول های قرمز در محیط بلاد آگار است و به سه نوع تقسیم می شود:

- **همولیز آلفا**: تخریب ناقص گلبول های قرمز و به وجود آمدن رنگ سبز در اطراف کلنی که به علت به وجود آمدن مت هموگلوبین است.
- **همولیز بتا**: لیز کامل گلبول های قرمز است، در اطراف کلنی کاملا شفاف می شود.
- **همولیز گاما**: هیچ گونه همولیزی دیده نمی شود.

بررسی همولیز

بررسی همولیز

باکتری گرم مثبت	همولیز آلفا	پنوموکوک، استرپتوکوک ویریدانس، انتروکوک، کلستریدیوم بوتولینیوم
	همولیز بتا	استرپتوکوک پیوژن،استرپتوکوک گروه B ، لیستریا، کلستریدیوم تتانی
باکتری گرم متغیر	همولیز بتا	گاردنلا واژینالیس
باکتری گرم منفی	همولیز آلفا	فرانسیسلا
	همولیز بتا	اشرشیاکلی، بورخولدریا(بعضی سویه ها) ، اسینتوباکتر

تست تعیین حساسیت به باسیتراسین ۰.۰۴

- برای تشخیص احتمالی استرپتوکوک های بتا همولتیک گروه A
- حساسیت بالا ولی اختصاصیت کمی دارد.
- بیش از ۱۰٪ سویه های استرپتوکوک های گروه C وG و همچنین حدود ۵٪ سویه های گروه B به باسیتراسین حساسیت دارند.

بنابراین تست باسیتراسین به همراه با تست حساسیت با SXT (تری متوپریم سولفامتوکسازول) انجام می شود چون استرپتوکوک های گروه A و B به SXT مقاوم هستند.

تست تعیین حساسیت به باسیتراسین ۰.۰۴

توجه: این تست فقط برای استرپتوکوک های B همولتیک انجام شود زیرا بسیاری از استرپتوکوک های آلفا همولتیک (شامل پنوموکوک) با باسیتراسین با غلظت کم حساس هستند.

گروه استرپتوکوک	حساسیت به باسیتراسین	حساسیت به تری متوپریم سولفامتوکسازول
گروه A	حساس	مقاوم
گروه B	مقاوم / ۵٪ از سویه ها حساس	مقاوم
غیر از گروه A و B	حساس/مقاوم	حساس

روش انجام تست تعیین حساسیت به باسیتراسین ۰.۰۴

- سه تا چهار کلنی از استرپتوکوک های بتا همولتیک را بوسیله لوپ برداشته و در مرکز نصف پلیت بلاد آگار تلقیح کنید.
- با استفاده از لوپ یا سوآپ استریل کلنی های تلقیح شده را روی نصف محیط بلاد آگار پخش کنید تا رشد یکنواختی ایجاد شود.
- با پنس استریل دیسک باسیتراسین را روی ناحیه تلقیح شده قرار دهید، دیسک را با پنس به آرامی فشار دهید تا به سطح آگار بچسبد.
- پلیت را در دمای 35°C در حضورCO_2 انکوبه نمایید و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد را اندازه گیری کنید.

تست تعیین حساسیت به باسیتراسین ۰.۰۴

- **نتیجه حساس**: هاله عدم رشد بیشتر از ۱۰mm
- **نتیجه مقاوم**: بدون هاله یا هاله کمتر از ۱۰mm
- **توجه**: در کتاب Bailey & Scotts هر میزان هاله عدم رشد را نتیجه حساس تلقی کرده است.
- **سویه کنترل مثبت**: سوش ATCC استرپتوکوک پیوژن ۱۹۶۱۵
- **سویه کنترل منفی**: سوش ATCC استرپتوکوک آگلاکتیه ۱۲۳۸۶
- **تعداد دفعات انجام**: هر سری خرید و سپس هر ماه

در کتاب بیلی اسکات : هر هاله عدم رشد حساس تلقی می شود. (به بروشور دیسک مراجعه نمایید.)

کنترل کیفیت و تفسیر تست تعیین حساسیت به باسیتراسین ۰.۰۴

تست تشخیصی	نام معرف	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی انجام	تعداد دفعات	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
حساسیت به باسیتراسین	دیسک باسیتراسین ۰.۰۴					استرپتوکوک پیوژن	۱۹۶۱۵	هاله عدم رشد بیشتر از ۱۰mm				هر سری خرید و سپس هر ماه		
حساسیت به باسیتراسین	دیسک باسیتراسین ۰.۰۴					استرپتوکوک آگلاکتیه	۱۲۳۸۶	بدون هاله یا هاله کمتر از ۱۰mm				هر سری خرید و سپس هر ماه		

روش انجام تست تعیین حساسیت به نووبیوسین µg 5

- از کلنی مورد آزمون سوسپانسیونی مطابق با کدورت نیم مک فارلند تهیه نموده و آن را روی محیط مولر هینتون در سه جهت کشت دهید.
- دیسک نووبیوسین را روی آگار قرار دهید.
- پلیت را برای ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد قرار دهید.
- سپس پلیت را بررسی نمایید و قطر هاله ممانعت از رشد را با خط کش اندازه گیری نمایید.

کنترل کیفیت و تفسیر تست تعیین حساسیت به نووبیوسین 5 µg

- **نتیجه حساس**: هاله عدم رشد بیشتر و مساوی ۲۲ mm
- **نتیجه مقاوم**: هاله عدم رشد کمتر و مساوی ۱۵ mm
- **سویه کنترل حساس**: سوش ATCC استافیلوکوک آرئوس ۲۵۹۲۳
- **سویه کنترل مقاوم**: سوش ATCC استافیلوکوک ساپروفیتوکوس ۱۵۳۰۵
- **تعداد دفعات انجام**: هر سری خرید و سپس هر ماه
- سویه استافیلوکوک ساپروفیتوکوس سویه مقاوم است که باید هاله عدم رشد کمتر از ۱۵ mm داشته باشد.
- برای سوش حساس می توان به جای سوش حساس استافیلوکوک آرئوس از سوش استافیلوکوک اپیدرمیدیس استفاده کرد.

کنترل کیفیت و تفسیر تست تعیین حساسیت به نووبیوسین µg 5

تست تشخیصی	نام معرف	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
حساسیت به نووبیوسین	دیسک نووبیوسین					استافیلوکوک آرئوس (سوش حساس)	۲۵۹۲۳	بیشتر مساوی ۲۲mm				هر سری خرید و سپس هر ماه		
حساسیت به نووبیوسین	دیسک نووبیوسین					استافیلوکوک ساپروفیتوکوس (سوش مقاوم)	۱۵۳۰۵	کمتر مساوی ۱۵ mm				هر سری خرید و سپس هر ماه		

تست حساسیت به اپتوچین

هدف آزمایش:

- از این آزمون برای بررسی اثر دیسک اتیل هیدروکوپرین هیدروکلرید (اپتوچین) بر ارگانیسم استفاده می شود.
- اپتوچین یک آنتی بیوتیک است و با تداخل در عملکرد ATPase که مسئول تولید انرژی است از رشد ارگانیسم جلوگیری می کند.

روش انجام:

- ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری نیم مک فارلند تهیه (در محیط براث) و روی محیط بلادآگارحاوی ۵٪ خون گوسفندی به صورت سفره ای کشت داده شود و سپس با یک پنس استریل دیسک را روی محیط قرار داده شود و برای ۱۸ تا ۲۴ ساعت در 35°C به همراه دی اکسید کربن ۵٪ انکوبه نمایید، بعد از مدت انکوباسیون قطر هاله عدم رشد مورد بررسی قرار می گیرد.

تست حساسیت به اپتوچین

- **تفسیر نتیجه:**

- دیسک ۱۰mm باید هاله عدم رشد ≤ ۱۶ mm ایجاد کند تا حساس باشد
- دیسک ۶ mm باید هاله عدم رشد ≤ ۱۴mm باشد تا حساس تلقی گردد.
- در مورد سوش مقاوم که انتروکوک فکالیس است، هیچ هاله ای نباید مشاهده گردد.
- به جای انتروکوک فکالیس می توانید از سوش استرپتوکوک میتیس استفاده نمایید.
- در صورتی که قطر هاله عدم رشد پنوموک کمتر از ۱۴ و یا ۱۶ باشد باید تست حلالیت در صفرا انجام شود، (حلالیت در صفرا پنوموکوک مثبت است.)

تست تشخیصی	نام معرف	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
حساسیت به دیسک اپتوچین	دیسک اپتوچین mm۱۰					استرپتوکوک پنوموکوک (حساس)	۴۹۶۱۲	هاله عدم رشد بیشتر مساوی ۱۶ mm				هر سری خرید و سپس هر ماه		
حساسیت به دیسک اپتوچین	دیسک اپتوچین ۶ mm					استرپتوکوک پنومونیه (حساس)	۴۹۶۱۲	هاله عدم رشد بیشتر مساوی ۱۴ mm				هر سری خرید و سپس هر ماه		
حساسیت به دیسک اپتوچین	دیسک اپتوچین ۱۰ mm					استرپتوکوک فکالیس (مقاوم)	۲۹۲۱۲	بدون هاله عدم رشد				هر سری خرید و سپس هر ماه		
حساسیت به دیسک اپتوچین	دیسک پتوچین ۶ mm					استرپتوکوک فکالیس (مقاوم)	۲۹۲۱۲	بدون هاله عدم رشد						

تست حلالیت در صفرا

هدف آزمایش: برای افتراق پنوموکوک از استرپتوکوهای آلفا همولتیک استفاده می شود.

اساس آزمایش: صفرا مانند سدیم دزوکسی کولات) باعث لیز شدن سریع کلنی پنوموکوک می شود.

این لیز شدن وابسته به حضور آنزیم های داخل سلولی اوتولتیک (آمیداز) است.

روش انجام: یک یا ۲ قطره از سدیم دزوکسی کولات ۱۰٪ را بر روی کلنی خالص و تازه ۱۸ تا ۲۴ ساعته اضافه کنید. (اگر این آزمایش در لوله انجام می شود از سدیم دزوکسی کولات ۲٪ استفاده شود.)

سپ مایع بر روی پلیت را به آرامی شسته و پلیت را ۳۰ دقیقه در دمای 35°c قرار دهید و در نهایت لیز شدن باکتری را بررسی نمایید.

تست حلالیت در صفرا

- **نتایج قابل انتظار**:

➢ **نتیجه مثبت**: لیز شدن کلنی و باقی ماندن اثر یا هاله ای از کلنی

➢ **نتیجه منفی**: پایدار بودن کلنی

➢ **محدودیت ها:** در محیط های کشت کهنه فعالیت آنزیم کاهش می یابد.

➢ کنترل کیفیت:

➢ **کنترل مثبت**: استرپتوکوک پنومونیه (ATCC 49619)

➢ **کنترل منفی**: انتروکوک فکالیس (ATCC 29212)

تست حلالیت در صفرا

تست تشخیصی	نام معرف	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
حلالیت در صفرا به روش لوله ای	سدیم دزوکسی کولات ٪۲					استرپت وکوک پنومونیه (کنترل مثبت)	۴۹۶۱۹					هر سری خرید و سپس هر ماه		
حلالیت در صفرا به روش پلیت	سدیم دزوکسی کولات ٪۱۰					انتروکوک فکالیس (کنترل منفی)	۲۹۲۱۲					هر سری خرید و سپس هر ماه		

تست کمپ

- **هدف آزمایش:**

➢ این تست برای شناسایی استرپتوکوک ها گروه B (استرپتوکوک آگالاگتیه) از سایر استرپتوکوک ها استفاده می شود.

➢ استرپتوکوک های گروه B پروتئین خارج سلولی به نام فاکتور کمپ ترشح می کنند که با بتا لیزین استافیلوکوک آرئوس به صورت سینرژیک عمل نموده و سبب افزایش لیز گلبول های قرمز خون می شوند.

- **روش انجام:**

➢ ابتدا در وسط محیط بلاد آگار یک خط مستقیم از استافیلوکوک آرئوس مولد بتا لیزین کشت داده می شود و سپس استرپتوکوک مورد نظر عمود بر خط کشت استافیلوکوک آرئوس کشت داده می شود به طوری که این دو با هم برخورد و تداخل نکنند.

کنترل کیفیت تست کمپ

- **نتایج قابل انتظار:**

➢ **مثبت**: تشدید همولیز و تشکیل شکلی شبیه نوک فلش

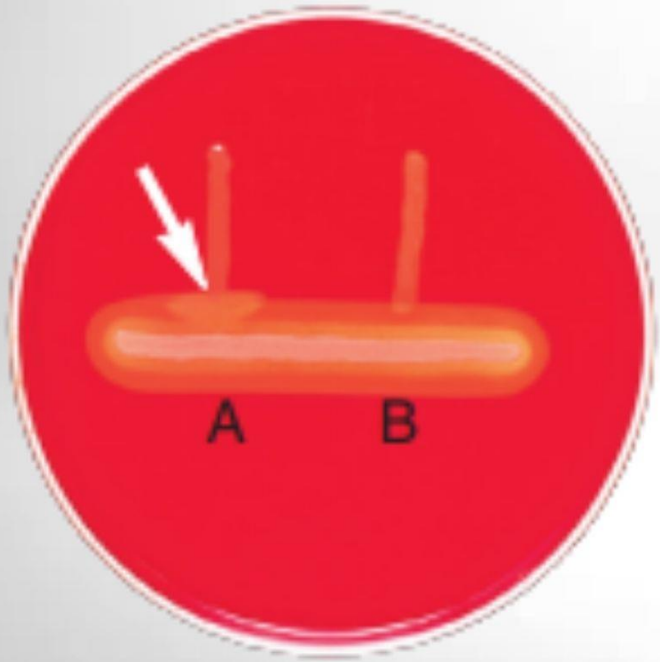
➢ **منفی**: بدون افزایش همولیز

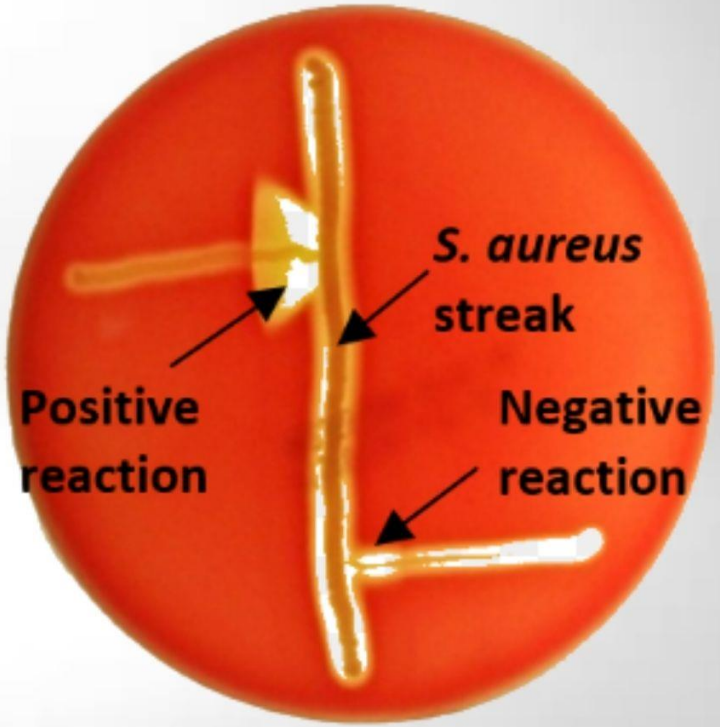
- **کنترل کیفی:**

➢ **کنترل مثبت**: استرپتوکوک آگالاکتیه (ATCC13813) تشدید همولیز و تشکیل شکلی شبیه نوک فلش

➢ **کنترل منفی**: استرپتوکوک پیوژن (ATCC19615) بدون افزایش همولیز

Christie-Atkins-Munch-Peterson test (CAMP)





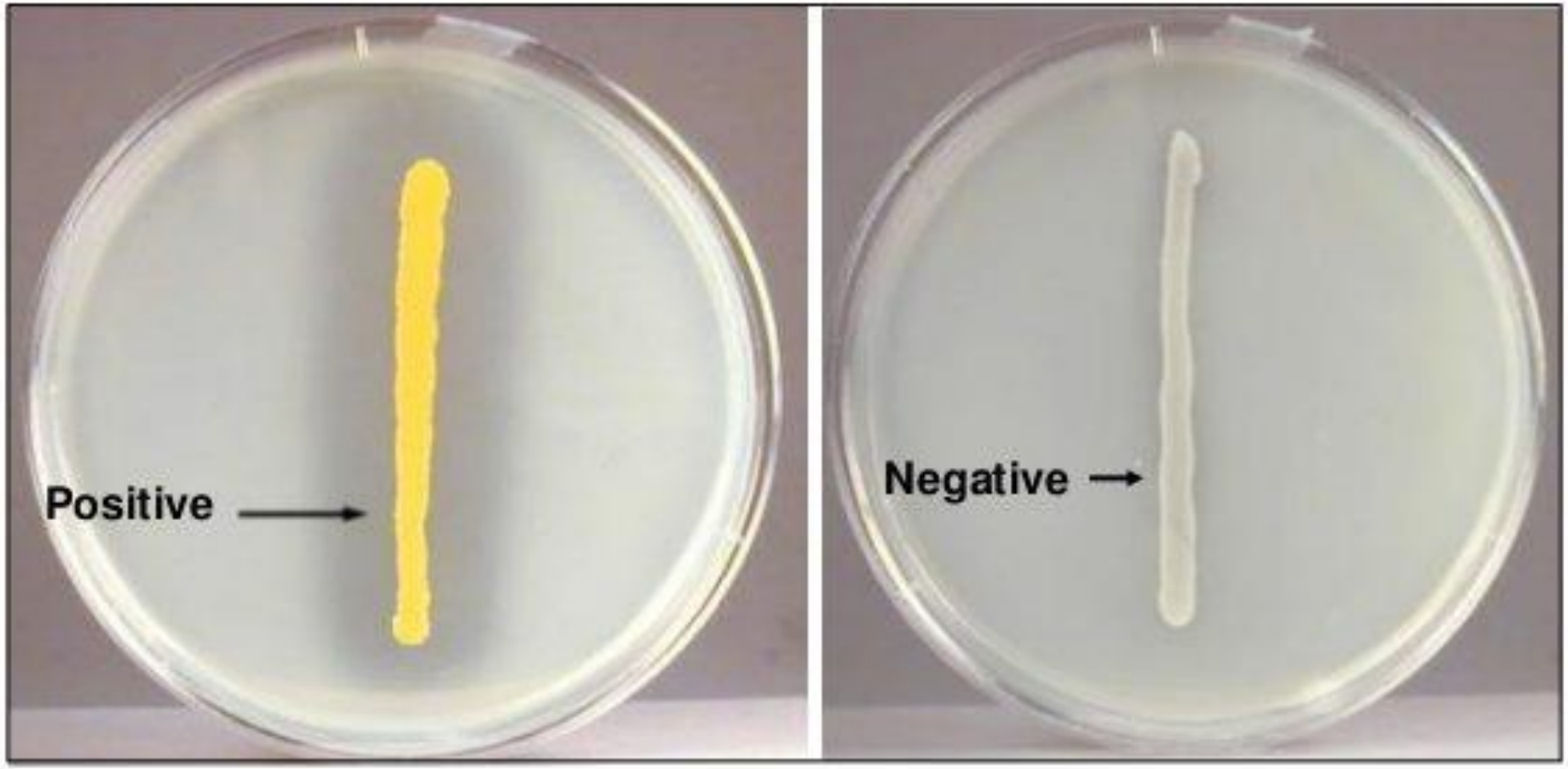
کنترل کیفیت تست کمپ

تست تشخیصی	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی انجام	تعداد دفعات	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست کمپ	استرپتوکوک آگالاکتیه (کنترل مثبت)	۱۳۸۱۳	تشدید همولیز و تشکیل شکلی شبیه نوک فلش				هر سری خرید و سپس هر ماه		
تست کمپ	استرپتوکوک پیوژن (کنترل منفی)	۱۹۶۱۵	بدون افزایش همولیز				هر سری خرید و سپس هر ماه		

هیدرولیز دزوکسی ریبونوکلئیک اسید (تست Dnase آگار)

- **هدف آزمایش:**

- برای تمایز باکتری های دارای آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز استفاده می شود.
- این آزمون بر توانایی ارگانیسم در هیدرولیز دزوکسی ریبونوکلئیک اسید استوار است. رنگ محیط سبز کم رنگ است (به خاطر کمپلکس DNA- متیل گرین) با رشد باکتری در این محیط به علت هیدرولیز DNA، رنگ سبز ناپدید(رنگ متیل گرین آزاد در PH:7.3 رنگ خود را از دست می دهد.) و در اطراف محل رشد باکتری هاله شفاف ایجاد می گردد.
- **حساسیت**: ۹۹٪ استافیلوکوک های کوآگولاز مثبت، Dnase مثبت نیز هستند.
- **اختصاصیت**: ۲۰٪ استافیلوکوک های کوآگولاز منفی، Dnase مثبت هستند. (از تست Dnase به جای کوآگولاز نمی توان استفاده کرد.)


Positive
Negative

هیدرولیز دزوکسی ریبونوکلئیک اسید (تست Dnase آگار)

- **روش انجام** : تعدادی از کلنی های خالص باکتری به محیط کشت Dnase آگار تلقیح و در دمای 35°C تا 37°C به مدت ۱۳ تا ۲۴ ساعت انکوبه شود.

- **محدودیت ها:** برای تلقیح باکتری باید از محیط کشت مایع جوان یا از محیط آگار ۱۸ تا ۲۴ ساعته یک سوسپانسیون به وسیله یک تا دو میلی لیتر سرم فیزیولوژی ایجاد و سپس مورد استفاده قرار گیرد.

- **نتایج قابل انتظار:**

- **نتیجه مثبت**: زمانی که DNA هیدرولیز می شود متیل گرین آزاد می شود و در نتیجه در اطراف محل رشد باکتری هاله شفاف دیده می شود.

- **نتیجه منفی**: رنگ محیط سبز باقی می ماند.

هیدرولیز دزوکسی ریبونوکلئیک اسید (تست Dnase آگار)

- **کنترل کیفی:**

➢ **کنترل مثبت**: استافیلوکوک آرئوس (ATCC25923)

➢ **کنترل منفی**: اشرشیاکولی (ATCC25922)

➢ **نکته:** برای انجام این آزمایش روش ها و محیط کشت های متعددی مانند آگارز اریب شکل، تولوئن بلو(حلقه یا هاله کدر و صورتی رنگ در اطراف باکتری) مورد استفاده قرار می گیرد. پلیت های Dnase آگار بعد از انکوباسیون شبانه را می توان با اسید کلریدریک ۱ نرمال کاملا پوشاند و بررسی کرد. (وقتی از رنگ استفاده می شود لازم نیست از اسید برای نشان دادن فعالیت آنزیم استفاده کنید.)

هیدرولیز دزوکسی ریبونوکلئیک اسید (تست Dnase آگار)

تست تشخیصی	نام محیط کشت	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی انجام	تعداد دفعات	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست Dnase	محیط Dnase آگار					استافیلوکوک آرئوس) کنترل مثبت	۲۵۹۲۳	هاله شفاف اطراف محل رشد باکتری						
تست Dnase	محیط Dnase آگار					اشرشیاکولی(کنترل منفی)	۲۵۹۲۲	بدون هاله شفاف اطراف محل رشد باکتری، رنگ محیط سبز باقی می ماند						

تست ONPG (O- Nitrophenyl-B – D galactopyranoside)

اساس آزمایش:

- برای بررسی توانایی باکتری در تولید بتا گالاکتوزیداز(تبدیل لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز) استفاده می شود که یک آنزیم برای هیدرولیز ONPG (از نظر ساختاری شبیه به لاکتوز است) به محصول قابل رویت اورتونیتروفنول (زرد) است.
- برای تمایز انتروباکتریاسه های تخمیرکننده لاکتوز از غیرتخمیرکننده ها کاربرد دارد.

تست ONPG (O- Nitrophenyl-B – D galactopyranoside)

- **روش انجام:**

- کلنی های مورد آزمایش را در ۰.۵ ml سرم فیزیولوژی استریل تلقیح نمایید و سوسپانسیون غلیظی معادل ۲ مک فارلند تهیه نمایید.
- دیسک ONPG را به لوله اضافه نمایید.
- لوله را به مدت ۴ تا ۶ ساعت در شرایط هوازی و در دمای 35°C انوبه نمایید.
- تغییر رنگ به زرد را مشاهده نمایید.

تست ONPG (O- Nitrophenyl-B – D galactopyranoside)

- **تفسیر نتیجه آزمایش:**

- نتیجه مثبت: تغییر رنگ زرد
- نتیجه منفی: عدم تغییر رنگ
- کنترل مثبت: سوش E coli ATCC با شماره ۲۵۹۲۲
- کنترل منفی: سوش ATCC پروتئوس میرابلیس با شماره ۲۹۲۴۵

تست ONPG (O- Nitrophenyl-B – D galactopyranoside)

تست تشخیصی	نام دیسک	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست ONPG	دیسک ONPG					پروتئوس میرابلیس (کنترل منفی)	۲۹۲۴۵	منفی، بدون تغییر رنگ				هر سری خرید یا ساخت محیط و سپس هر ماه		
تست ONPG	دیسک ONPG					E coli (کنترل مثبت)	۲۵۹۲۲	مثبت، تغییر رنگ زرد				هر سری خرید یا ساخت محیط و سپس هر ماه		

تست PYR (L- pyrrolidonyl – B- Naphthylamide)

هدف آزمایش:

- برای شناسایی استرپتوکوک های گروه A (استرپتوکوک پیوژن) و انتروکوک با بررسی حضور آنزیم ال پیرولیدونیل آریلامیداز انجام می شود.
- سوبسترای L- pyrrolidonyl – B- Naphthylamide تحت تاثیر آنزیم L- Pyrroglutamylaminopeptidase به نفتیل آمین (B- naphthylamine) تبدیل می شود و با معرف ان–ان متیل آمینوسینامالدهید رنگ قرمز تولید می شود.

تست PYR (L- pyrrolidonyl – B- Naphthylamide)

- **به دو روش انجام می شود:** ۱- روش استفاده از براث ۲- روش استفاده از دیسک
- **روش استفاده از براث**: از دو تا سه کلنی شبیه به هم از باکتری مورد آزمون در حجم کمی از براث PYR سوسپانسیون تهیه نمایید.
  - براث را در 35°C به مدت ۴ ساعت انکوبه نمایید.
  - یک قطره معرف PYR را اضافه نموده و تغییر رنگ را بررسی نمایید،
  - واکنش باید در مدت یک دقیقه بعد از افزودن معرف قرائت شود.

تست PYR (L- pyrrolidonyl – B- Naphthylamide)

- **تفسیر:**

➢ نتیجه مثبت: ایجاد رنگ قرمز آلبالویی در مدت یک دقیقه

➢ نتیجه منفی: رنگ زرد یا عدم تغییر رنگ

تست PYR (L- pyrrolidonyl – B- Naphthylamide)

- **روش استفاده از دیسک:**

- دیسک PYR را بوسیله پنس روی لام قرار دهید.
- دیسک را سرم فیزیولوژی استریل کمی مرطوب نمایید (نباید در سرم فیزیولوژی غوطه ور شود)
- یک یا دو لوپ از کشت ۱۸ الی ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر را بردارید.
- آن را روی دیسک بکشید.
- اجازه دهید دو دقیقه بگذرد تا واکنش صورت گیرد.
- سپس یک قطره معرف PYR را به دیسک اضافه نمایید و تغییر رنگ را بررسی کنید.

تست PYR (L- pyrrolidonyl – B- Naphthylamide)

- **تفسیر:**

➢ **نتیجه مثبت**: ایجاد رنگ قرمز آلبالویی یا صورتی روشن در مدت یک دقیقه

➢ **نتیجه منفی**: عدم تغییر رنگ یا آبی کمرنگ (به دلیل واکنش اندول مثبت)

➢ **توجه**: رنگ صورتی کم رنگ (واکنش ضعیف) منفی در نظر گرفته می شود.

تست PYR (L- pyrrolidonyl – B- Naphthylamide)

تست تشخیصی	نام معرف	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
PYR	معرف PYR					انتروکوک فکالیس (کنترل مثبت)	۲۹۲۱۲	مثبت صورتی پررنگ تا قرمز				هر سری ساخت یا خرید و هر ماه		
						E Coli کنترل منفی	۲۵۹۲۲	صورتی کم رنگ بدون رنگ				هر سری ساخت یا خرید و هر ماه		

محیط TSI (Triple Sugar Iron)

این محیط حاوی ۳ قند ساکارز(۱۰ قسمت)، لاکتوز(۱۰قسمت) و گلوکز (۱ قسمت) و پپتون است.

فنل رد و فروس سولفات به ترتیب به عنوان به اندیکاتور تولید اسید و تولید سولفید هیدروژن در این محیط استفاده شده است.

تولید اسید محیط را زرد و تولید محصولات قلیایی (آلکالین) محیط را قرمز نگه می دارد.

محیط TSI (Triple Sugar Iron)

- 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 Agar TSI 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°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.

محیط TSI (Triple Sugar Iron)

- **تفسیر نتایج:**

- 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.
- 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.
- تولید سولفید هیدروژن سبب تولید رسوب سیاه در عمق لوله می شود.
- تولید گاز با شکاف و ترک خوردگی محیط نشان داده می شود.

کنترل کیفی محیط TSI (Triple Sugar Iron)

ارگانیسم	سطح شیبداری	عمق	گاز	SH2
Escherichia coli ATCC 25922	A	A	+	-
Pseudomons aeruginosa ATCC 27853	K	K	-	-
Salmonella typhimurium ATCC 14028	K	A	+	+
Shigella flexneri ATCC 12022	K	A	-	-

تولید SH2

- **اساس آزمایش**: بعضی از باکتری ها قادرند با فعالیت آنزیمی خود از اسیدآمینه های حاوی سیستئین و متیونین سولفید هیدروژن تولید کنند و محیط تریپل شوگر آیرون آگار (Triple Sugar Iron) یا SIM را سیاه می کند.

- بعضی از ارگانیسم ها بر روی محیط کلیگر آیرون آگار (KIA) تولید سولفید هیدروژن می کنند اما روی محیط TSI به علت وجود ساکارز در این محیط اثری از این گاز دیده نمی شود به همین خاطر بعضی از اعضای انتروباکتریاسه ها نمی توانند بر روی محیط TSI تولید سولفید هیدروژن کنند.

- معرف سولفات فروس در محیط TSI به عنوان معرف تولید سولفید هیدروژن است که نسبت به سایر نمک های فریک دارای حساسیت کمتری است و ممکن است در تولید سولفید هیدروژن در TSI و SIM مغایرت دیده می شود.

تولید SH_2

- **نتایج قابل انتظار:**

➢ نتیجه مثبت: تغییر رنگ محیط به سیاه

➢ نتیجه منفی: عدم تغییر رنگ محیط

- **کنترل کیفیت:**

➢ کنترل مثبت: پروتئوس میرابلیس (ATCC 12453)

➢ کنترل منفی: اشرشیاکلی (ATCC 25922)

تولید SH2

هیدرولیز هیپورات

- **هدف ازمایش:**

➢ برای شناسایی باکتری هایی استفاده می شود که به واسطه داشتن آنزیم هیپوریکاز قابلیت هیدرولیز هیپوریک اسید را دارا هستند.

- **اساس آزمایش:**

➢ محصول نهایی هیدرولیز هیپوریک اسید توسط آنزیم هیپوریکاز، گلیسین و بنزوئیک اسید است. افزودن معرف نین هیدرین باعث تغییر رنگ محیط به رنگ بنفش تیره می شود.

هیدرولیز هیپورات

- **روش انجام:**

- ۰.۱ ml از آب مقطر استریل به لوله پلاستیکی اضافه و سپس تعداد زیادی از کلنی باکتری اضافه و یک سوسپانسیون تهیه شود.
- در مرحله بعد با یک پنس استریل یک دیسک هیپورات به سوسپانسیون اضافه و لوله برای ۲ ساعت در دمای 35°c نگهداری شود.
- در نهایت ۰.۲ ml معرف نین هیدرین به ترکیب اضافه و دوباره ۱۵ تا ۳۰ دقیقه انکوبه کرده و تغییر رنگ (بنفش) در عمق لوله بررسی قرار گیرد.

هیدرولیز هیپورات

- **نتایج قابل انتظار:**

➢ نتیجه مثبت: رنگ بنفش

➢ نتیجه منفی: بدون رنگ، صورتی تا زرد

➢ کنترل مثبت: استرپتوکوک آگالاکتیه (TACC 12386)

➢ کنترل منفی: استرپتوکوک پیوژن (ATCC 19615)

- **محدودیت ها:**

➢ در صورتی که زمان خواندن نتیجه آزمون پس از اضافه کردن بیش از سی دقیقه طول بکشد، می تواند مثبت کاذب ایجاد کند.

هیدرولیز هیپورات

هیدرولیز هیپورات

تست تشخیصی	نام معرف	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
هیدرولیز هیپورات	دیسک هیپورات					استرپتوکوک آگالاکتیه (کنترل مثبت	۱۲۳۸۶	رنگ بنفش				هر سری ساخت یا خرید و سپس هر ماه		
						استرپتوکوک پیوژن (کنترل منفی)	۱۹۶۱۵	بدون رنگ، صورتی تا زرد				هر سری ساخت یا خرید و سپس هر ماه		

آزمایش متیل رد (MR)

روش انجام:

- در یک لوله حاوی ۵ میلی لیتر محیط براث MR-VP، کلنی ارگانیسم مورد نظر را تلقیح نمایید.
- حداقل به مدت ۴۸ ساعت در دمای 35°C انکوبه نمایید.
- ۱ mm از محیط براث ۴۸ ساعته را در یک لوله ۱۰۰* ۱۳ mm منتقل کنید.
- باقیمانده براث را برای آزمایش احتمالی نگه دارید.
- ۳ تا ۶ قطره معرف MR به لوله ۱mm براث اضافه نمایید.
- بلافاصله لوله را از نظر تغییر رنگ بررسی نمایید.
- **توجه**: مدت انکوباسیون برای MR ۴۸ ساعت است.

آزمایش متیل رد (MR)

- **تفسیر:**

- **نتیجه مثبت:** رنگ قرمز واضح
- **نتیجه منفی:** بدون رنگ
- **کنترل مثبت**: سوش ATCC اشرشیاکلی با شماره ۲۵۹۲۲
- **کنترل منفی**: سوش ATCC کلبسیلا پنومونیه با شماره ۱۳۸۸۳
- **توجه**: رنگ قرمز نارنجی مثبت ضعیف است، اگر رنگ نارنجی دیده شد باقیمانده براث را تا ۴ روز انکوبه نمایید و بعد از این مدت آزمایش را تکرار کنید. در این موارد می توانید همزمان لوله براث دیگری را تلقیح نموده و آزمایش را در دمای 25°C تکرار نمایید.

کنترل کیفی تست متیل رد (MR)

تست تشخیصی	نام معرف و محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی در صورت نیاز	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
MR	محیط MRVP معرف متیل رد					E Coli کنترل مثبت	۲۵۹۲۲	مثبت: قرمز پررنگ						
						کلبسیلا پنومونیه کنترل منفی	۱۳۸۸۳	منفی: بدون تغییر رنگ						

آزمایش متیل رد (MR)

- **محدودیت های تست MR**

- از تلقیح زیاد میکروارگانیسم در براث اجتناب کنید وقتی تلقیح به طور تقریبی $۱۰^{۹}$ سلول زنده درml باشد رشد باکتری مهار می شود.
- اگر زمان انکوباسیون قبل از اضافه کردن معرف MR کافی نباشد ممکن است واکنش مثبت کاذب ایجاد می شود.

تست VP (Voges proskauer)

- **روش انجام آزمایش برای باسیل های گرم منفی**

- حدود ۵ ml محیط براث MR-VP در هر لوله بریزید و در یک لوله براث، کلنی ارگانیسم مورد آزمایش را تلقیح کنید و در 35°C به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت انکوبه نمایید، درپوش لوله را شل ببندید.
- از آنجاییکه محیط کشت براث به حجم ۵ml استفاده می شود، باید ۲ ml از براث را به یک لوله ۱۳*۱۰۰ میلی متری منتقل کنید و باقیمانده را برای انکوباسیون مجدد احتمالی نگه دارید.
- شش قطره آلفا نفتول ۵٪ اضافه نمایید و خوب مخلوط کنید تا اکسیژن موجود در هوا به آن برسد.
- سپس دو قطره هیدروکسید پتاسیم ۴۰٪ اضافه کنید و خوب مخلوط کنید تا اکسیژن هوا به آن برسد.
- ایجاد رنگ قرمز و صورتی را در عرض ۵ دقیقه در سطح لوله بررسی کنید، لوله را در طی این ۵ دقیقه به آرامی تکان دهید.

تست VP (Voges proskauer)

- **روش انجام آزمایش برای استرپتوکوک ها (روش Coblentz)**

- چندین کلنی رشد یافته ۲۴ ساعته از محیط بلاد آگار(heavily inoculate) به محیط براث MR-VP تلقیح کنید.
- محیط براث را در دمای 35°C برای مدت ۶ ساعت انکوبه نمایید.
- ml ۱.۲ (۱۲ قطره) معرف آلفانفتول به ml۲ از محیط براث MR-VP اضافه نمایید.
- KOH ml ۰.۴ ٪۴۰ (۴ قطره) اضافه نمایید و لوله را تکان دهید و پس از گذشت ۳۰ دقیقه نتیجه را مشاهده کنید.

تست VP (Voges proskauer)

- **تفسیر**:

- **نتیجه مثبت:** ایجاد رنگ قرمز صورتی در سطح (رنگ قرمز آجری نتیجه مثبت ضعیف است.)
- **نتیجه منفی**: عدم مشاهده رنگ قرمز صورتی، رنگ مسی باید منفی در نظر گرفته شود.
- **کنترل مثبت**: سوش Enterobacter Cloacae ATCC با شماره ۱۳۰۴۷
- **کنترل منفی**: سوش ATCC اشرشیاکلی با شماره ۲۵۹۲۲
- **توجه**: اگر نتیجه منفی است باقیمانده براث MR-VP را تا ۴۸ ساعت انکوبه نمایید و آزمایش را تکرار کنید.

تست VP (Voges proskauer)

تست تشخیصی	نام معرف و محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	دفعات انجام آزمایش	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست VP	محیط MRVPو آلفا نفتول ۵٪ و هیدروکس ید پتاسیم ۴۰٪					Enterobacter Cloacae کنترل مثبت	۱۳۰۴۷	مثبت: رنگ قرمز صورتی						
						E Coli کنترل منفی	۲۵۹۲۲	منفی: بدون تغییر رنگ						

تست VP (Voges proskauer)

- **محدودیت های تست VP:**

- با انکوباسیون طولانی (۳ روز) بعضی ارگانیسم هایVP مثبت، ممکن است درمحیط شرایط اسیدی ایجاد کنند که باعث واکنش مثبت ضعیف یا منفی می شود.
- به ml ۲ محیط براث، بیش از ۲ قطره معرف KOH اضافه نکنید چون میزان اضافی KOH باعث مثبت کاذب می شود.
- بعدا ز اضافه کردن معرف VP تغییر رنگ را حداکثر در طی ۱ ساعت قرائت کنید در غیر این صورت ممکن است رنگ مسی ایجاد شود که باعث تفسیر نتیجه مثبت کاذب می گردد.

تست ایندول

هدف آزمایش:

- برای شناسایی میکروارگانیسم هایی استفاده می شود که توانایی هیدرولیز تریپتوفان دارند استفاده می شوند.

آنزیم تریپتوفاناز باکتری ها، تریپتوفان را به پیروات، آمونیاک و ایندول هیدرولیز می کنند.

- معرف کواکس (دی متیل آمین بنزآلدهید هیدروکلرید) وقتی به محیط اضافه شود با ایندول واکنش داده و یک حلقه قرمز ایجاد می کند.
- معرف جایگزین، واکنش گر ارلیخ (ارلیش) نامیده می شود که ترکیبی شبیه کواکس دارد با این تفاوت که در ترکیب ارلیخ اتیل الکل مطلق نیز وجود دارد و قابلیت اشتعال دارد و در تشخیص مقادیر کم ایندول دارای حساسیت بیشتری است.

تست ایندول

- **روش انجام:**

- میکروارگانیسم مورد نظر را به محیط کشت SIM نیمه جامد یا محیط براث حاوی تریپتوفان تلقیح کنید.
- توجه: از محیط های کشت حاوی رنگ مثل EMB و MAC استفاده نکنید.
- محیط را به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در 35°C انکوبه کنید.
- اگر از محیط براث استفاده می نمایید، قبل از اضافه نمودن معرف قسمتی از محیط را در لوله دیگری بریزید.
- ۳ قطره از معرف کواکس را از کنار لوله اضافه کرده و تغییر رنگ را درسطح محیط مشاهده نمایید.
- اگر نتیجه آزمایش منفی بود، در صورت نیاز بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون اضافه آزمایش را تکرار کنید.

تست ایندول

- **تفسیر:**

- **نتیجه مثبت**: ایجاد رنگ قرمز در مدت ۲۰ ثانیه
- **نتیجه منفی**: بی رنگ یا زرد کم رنگ
- **کنترل مثبت**: سوش ATCC اشرشیاکلی با شماره ۲۵۹۲۲
- **کنترل منفی**: سوش ATCC کلبسیلا پنومونیه با شماره ۱۳۸۸۳

تست ایندول

تست تشخیصی	نام معرف	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست ایندول	کواکس					E Coli (کنترل مثبت)	۲۵۹۲۲	مثبت: رنگ قرمز در ۲۰ ثانیه						
						کلبسیلا پنومونیه (کنترل منفی)	۱۳۸۸۳	منفی: بدون تغییر رنگ						

تست OF (Oxidation/Fermentation)

اساس آزمایش:

- این تست بررسی مصرف کربوهیدرات ها است.
- تعیین معرف اکسیداتیو یا تخمیر در شناسایی باکتری ها
- مصرف کربوهیدرات توسط باکتری که محصولات اسیدی در حضور یا غیاب اکسیژن تولید می شود را نشان می دهد.
- تولید اسید با تغییر در اندیکاتور PH مشخص می شود.
- از محیط OF حاوی مقادیر کم پپتون و کربوهیدرات مثل گلوکز استفاده می شود.

تست OF (Oxidation/Fermentation)

- **روش انجام:**

➢ باکتری مورد نظر را به داخل دو لوله O و F حاوی گلوکز تلقیح کنید.

➢ روی محیط O را باز و روی محیط F را روغن معدنی استریل بریزید تا از عبور اکسیژن جلوگیری کند.

➢ با مصرف گلوکز، اسید تولید شده، که باعث تغییر PH می شود.

➢ بر اساس نوع اندیکاتور به کار رفته تغییر رنگ های مختلفی اتفاق می افتد.

➢ **اندیکاتور بروموکرزول ارغوانی رنگ**: تغییر رنگ بنفش به زرد

➢ **اندیکاتور فنل قرمز**: تغییر رنگ از قرمز به زرد

➢ **اندیکاتور برم تیمول آبی**: تغییر رنگ سبز به زرد

تست OF (Oxidation/Fermentation)

- **تفسیر**

- تغییر رنگ از سبز به زرد در لوله پوشیده با روغن معدنی واکنش تخمیر
- تغییر رنگ از سبز به زرد در لوله سرباز واکنش اکسیداسیون

تست OF (Oxidation/Fermentation)

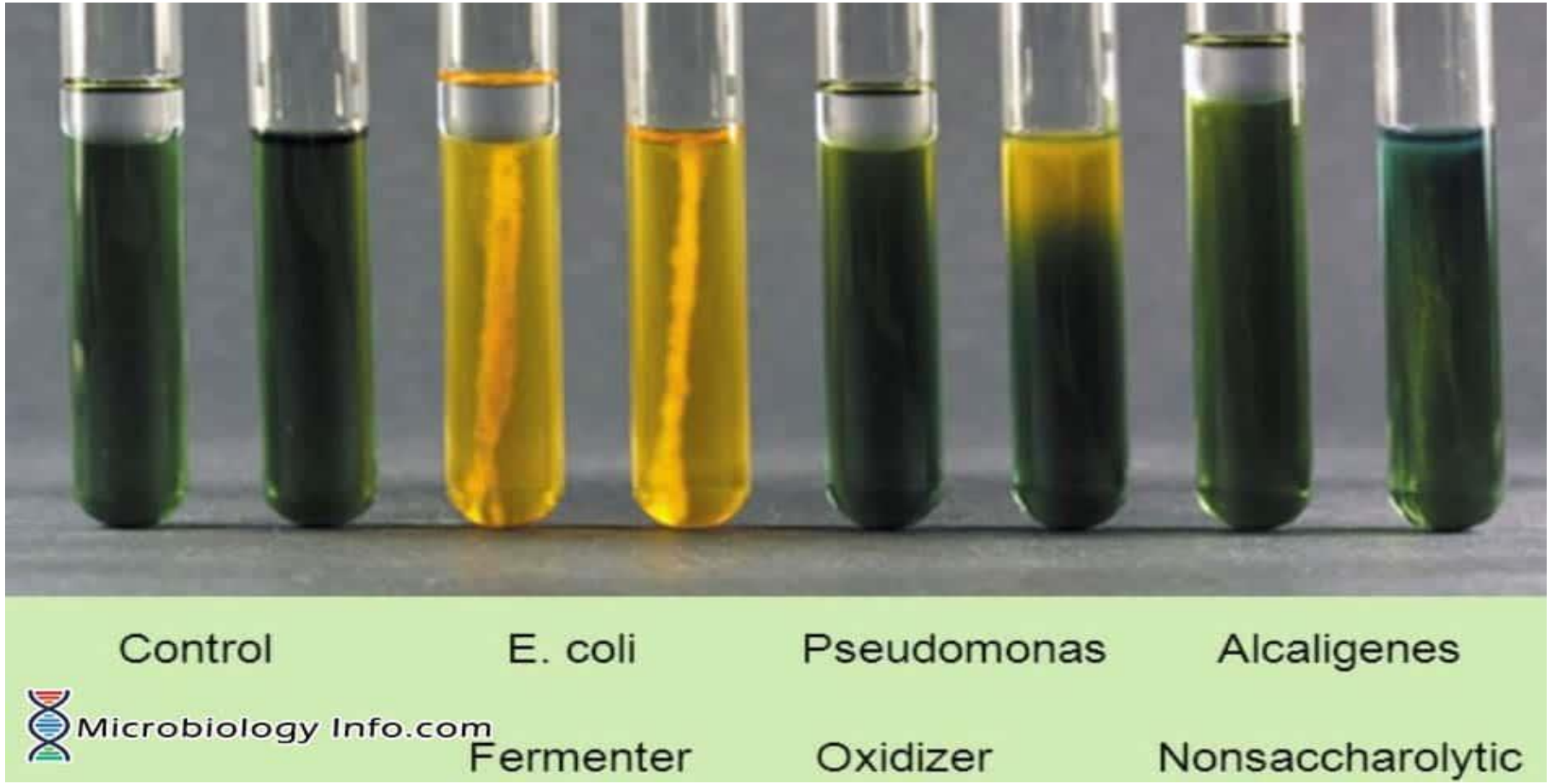
- **کنترل کیفیت:**

  - کنترل تخمیری: سوش ATCC اشرشیاکلی با شماره ۲۵۹۲۲
  - کنترل اکسیداتیو: سوش پسودوموناس آئروژینوزا با شماره ۲۷۸۵۳
  - کنترل غیر استفاده کننده: سوش Alcaligenes faecalis

تست OF (Oxidation/Fermentation)

- اگر هر دولوله رنگ زرد باشند باکتری مورد نظر هوازی بی هوازی اختیاری و نوع متابولیسم تخمیر است، مانند انتروباکتریاسه ها
- اگر هر دو لوله تغییر رنگ نداشت، باکتری توانایی تخمیر و اکسیداسیون را ندارد، غیر استفاده کننده مانند Alcaligenes faecalis
- اگر لوله دارای شرایط هوازی زرد و لوله دارای شرایط بی هوازی بدون تغییر باشد، باکتری توانایی رشد را فقط در شرایط هوازی دارد و هوازی اجباری است. (نوع متابولیسم اکسیداسیون و باکتری غیر تخمیری است مانند پسودوموناس

(Oxidation/Fermentation) OF تست



تست OF (Oxidation/Fermentation)

تست تشخیصی	نام محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست OF	محیط OF					E Coli (کنترل تخمیری)	۲۵۹۲۲	هر دو لوله زرد						
						پسودوموناس آئروژینوزا (کنترل اکسیداتیو)	۲۷۸۵۳	لوله هوازی زرد و لوله دارای روغن سبز						
						Alcaligenes faecalis (کنترل غیر استفاده کننده)		هر دو لوله سبز						

تست هیدرولیز اوره

- **هدف آزمایش**: این تست ارگانیسم هایی که توانایی تولید آنزیم اوره آز و هیدرولیز اوره را دارند شناسایی می کند.

➢ هیدرولیز اوره باعث تولید آمونیاک و CO_2 می شود، تشکیل آمونیاک باعث قلیایی شدن محیط و بالا رفتن PH می شود.

➢ افزایش PH با تغییر رنگ اندیکاتور فنل رد از نارنجی روشن به قرمز مشخص می شود.

➢ از محیط تازه کلنی باکتری به محیط اوره تلقیح نمایید.

➢ محیط اوره را در دمای $35^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت تا ۷ روز انوبه نمایید و در نهایت تغییر رنگ محیط را بررسی کنید.

تست هیدرولیز اوره

- **نتایج قابل انتظار:**

- **نتیجه مثبت**: تغییر رنگ به قرمز
- **نتیجه منفی**: عدم تغییر رنگ
- **کنترل کیفی**:
- **کنترل مثبت:** پروتئوس ولگاریس (ATCC 13315)
- **کنترل منفی**: اشرشیاکلی (ATCC 25922)

تست هیدرولیز اوره

تست تشخیصی	نام محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
هیدرولیز اوره	محیط اوره					پروتئوس ولگاریس (کنترل مثبت)	۱۳۳۱۵	تغییر رنگ به قرمز						
						اشرشیاکلی (کنترل منفی)	۲۹۹۲۲	عدم تغییر رنگ						

تست هیدرولیز اوره

آزمون تحمل نمک ۶.۵٪

هدف آزمایش:

- برای بررسی توانایی باکتری جهت رشد در غلظت بالای نمک استفاده می شود.
- برای تمایز انتروکوک ها (مثبت) از غیر انتروکوک ها (منفی) به کار می رود.

اساس آزمایش:

- انتروکوک در برابر غلظت نمک مقاوم است.
- از محیط مایع هارت اینفیوژن استفاده می شودکه شامل کلرید سدیم ۶.۵٪ نمک و کمی گلوکز و بروموکروزول ارغوانی (اندیکاتور به منظو تولید اسید) استفاده می شود.
- در محیط هایی که از اندیکاتور استفاده نشده است، وجود کدورت نشانه مثبت بودن تست است.

آزمون تحمل نمک ۶.۵٪

- **روش انجام:**

➢ ۱ یا ۲ کلنی خالص و جوان را به محیط مایع حاوی کلرید سدیم ۶.۵٪ افزوده و برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای 35°C انکوبه شود.

- **نتایج قابل انتظار:**

➢ **نتیجه مثبت:** کدورت قابل مشاهده در مایع با یا بدون ایجاد تغییر رنگ (از بنفش به زرد)

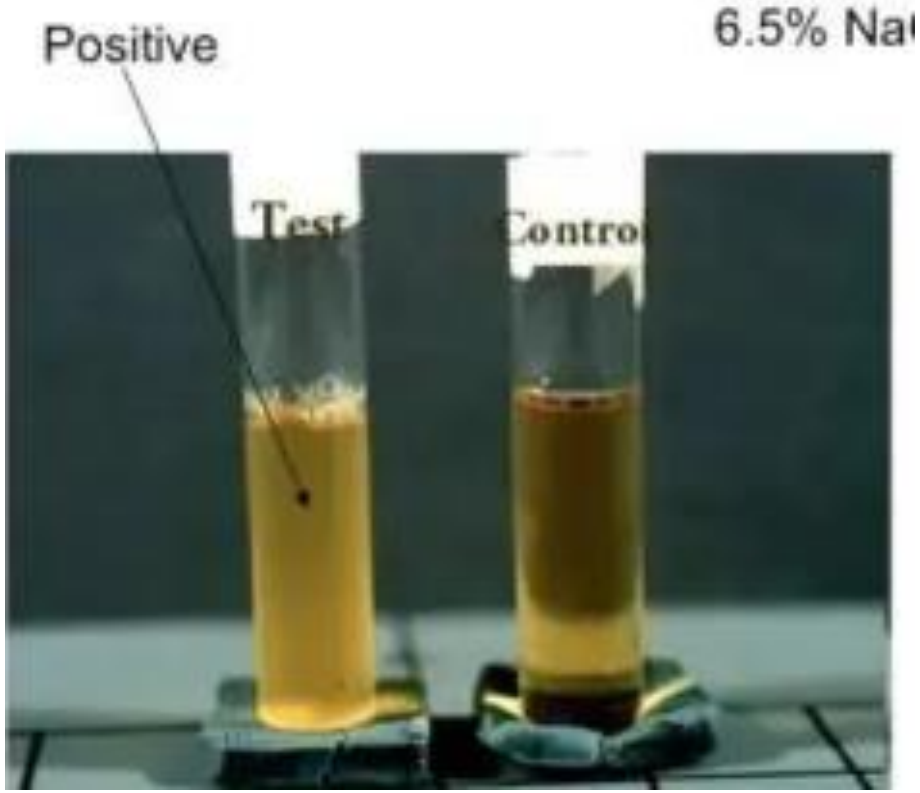
➢ **نتیجه منفی:** عدم وجود کدورت

➢ **توجه:** کدورت به تنهایی نتیجه مثبت بودن تست است.

آزمون تحمل نمک ۶.۵٪

- **کنترل کیفی:**
  - کنترل مثبت: انتروکوک فکالیس (ATCC 29212)
  - کنترل منفی: استرپتوکوک بویس (ATCC 9809)

آزمون تحمل نمک ۶.۵٪



آزمون تحمل نمک ۶.۵٪

تست تشخیصی	نام محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تحمل نمک ۶.۵٪	محیط مایع هارت اینفیوژن حاوی ۶.۵٪ نمک					انتروکوک فکالیس (کنترل مثبت)	۲۹۲۱۲	**نتیجه مثبت:** کدورت قابل مشاهده در مایع با یا بدون ایجاد تغییر رنگ (از بنفش به زرد)						
						استرپتوکوک بویس (کنترل منفی)	۹۸۰۹	عدم وجود کدورت						

تست حرکت (Motility test)

اساس آزمایش:

- این تست برای بررسی حرکت باکتریها استفاده می شود.
- باکتری ها برای حرکت احتیاج به فلاژل دارند.
- اغلب فلاژل ها در باسیل ها دیده می شوند، البته بعضی کوکسی ها هم دارای حرکت هستند.
- با یک نیدل استریل یک کلنی تازه و خالص را از وسط لوله آگار نیمه جامد مانند محیط SIM وارد کرده و در دمای 35°C حداکثر تا ۷ روز انکوبه نمایید.

تست حرکت (Motility test)

- **نتایج قابل انتظار**:

➢ **نتیجه مثبت:** گسترش رشد باکتری از کنار خط تلقیح به تمام سطح محیط

➢ **نتیجه منفی:** رشد محدود به خط تلقیح

➢ **کنترل کیفی**:

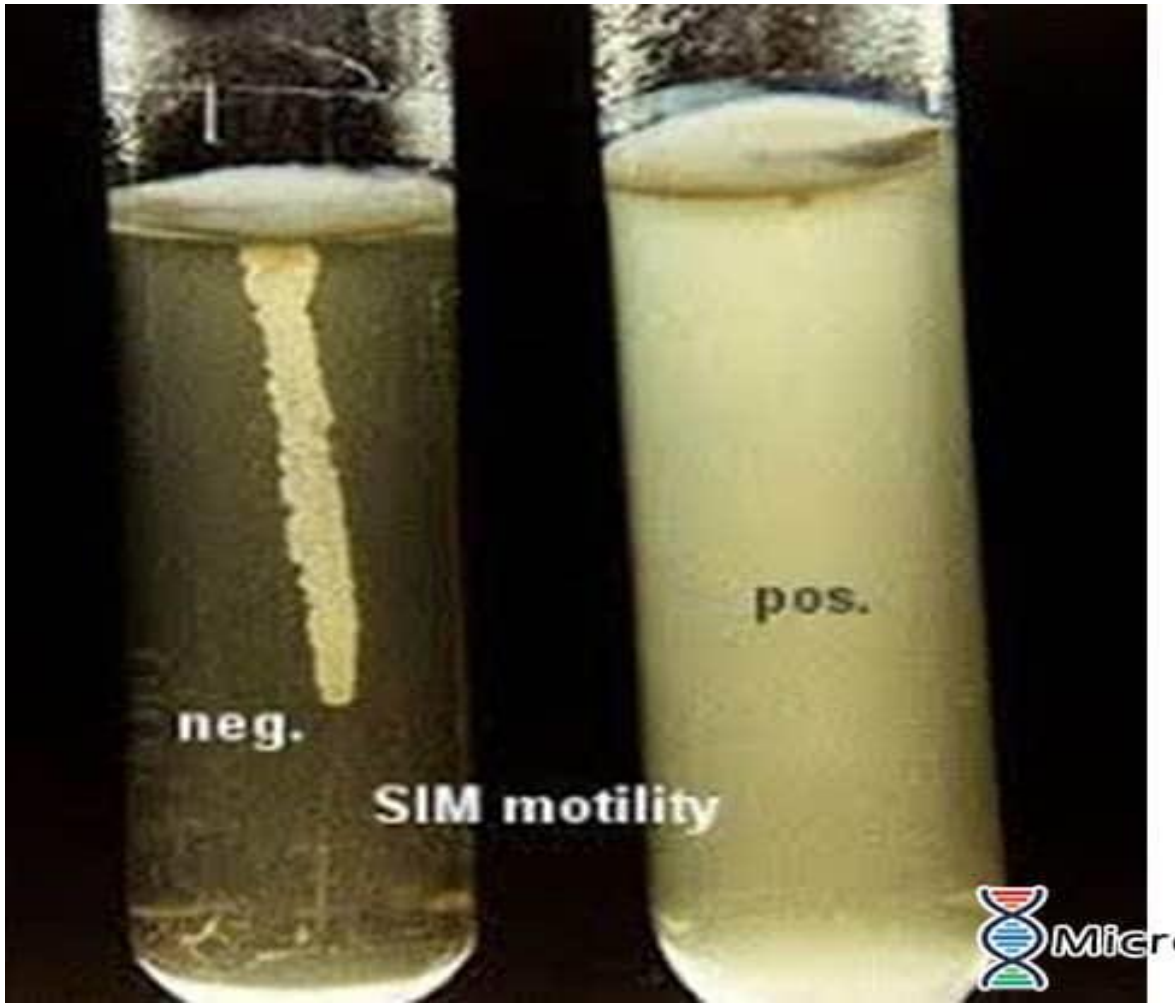
➢ **کنترل مثبت:** اشرشیاکلی (ATCC 25922)

➢ **کنترل منفی**: استافیلوکوک آرئوس (ATCC 25923)

تست حرکت (Motility test)

تست تشخیصی	نام محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست حرکت	محیط SIM					اشرشیاکلی (کنترل مثبت)	۲۵۹۲۲	گسترش رشد باکتری از کنار خط تلقیح به تمام سطح محیط						
						استافیلوکوک آرئوس (کنترل منفی)	۲۵۹۲۳	رشد محدود به خط تلقیح						

تست حرکت (Motility test)



تست دکربوکسیلاز (روش مولر)

- **هدف آزمایش:**

➢ برای افتراق انتروباکتریاسه های تولید کننده دکربوکسیلاز از سایر باکتری های گرم منفی استفاده می شود.این تست توانایی باکتری در تولید آنزیم دکربوکسیلاز را مشخص می کند.

- **اساس آزمایش:**

➢ باکتری با تولید آنزیم دکربوکسیلاز، اسیدهای آمینه موجود را در محیط هیدرولیز کرده و آمین تولید می کند.

➢ تولید آمین PH را قلیایی می کند که باعث تغییر رنگ محیط از نارنجی به بنفش می شود.

➢ در این تست از ۳ محیط دکربوکسیلازی آرژنین، لیزین و اورنیتین استفاده می شود.

تست دکربوکسیلاز (روش مولر)

- **روش انجام برای ارگانیسم غیر تخمیری گلوکز:**

- یک سوسپانسیون ۰.۵ مک فارلن از باکتری تازه بدست آمده از محیط کشت بلاد آگار در محیط برین هارت اینفیوژن مایع تهیه نمایید.
- ۴ قطره سوسپانسیون بدست آمده را در ۳ محیط دکربوکسیلازی که به ترتیب حاوی آرژنین، لیزین و اورنیتین است اضافه کنید.
- ۴ میلی متر روغن استریل بر روی سطح محیط کشت اضافه کنید زیرا باید شرایط بی هوازی برای عمل فرمانتاسیون ایجاد گردد.
- لوله های محیط کشت را در دمای 35°C تا 37°C در حضور اکسیژن برای مدت ۷ روز انکوبه نمایید.

تست دکربوکسیلاز (روش مولر)

- **روش انجام برای ارگانیسم تخمیری گلوکز:**

- یک سوسپانسیون ۰.۵ مک فارلن از باکتری تازه بدست آمده از محیط کشت بلاد آگار در محیط برین هارت اینفیوژن مایع تهیه نمایید.
- ۱ قطره از سوسپانسیون بدست آمده را در ۳ محیط دکربوکسیلازی که به ترتیب حاوی آرژنین، لیزین و اورنیتین است اضافه کنید.
- ۴ میلی متر روغن استریل بر روی سطح محیط کشت اضافه کنید زیرا باید شرایط بی هوازی برای عمل فرمانتاسیون ایجاد گردد.
- لوله های محیط کشت را در دمای 35°C تا 37°C در حضور اکسیژن برای مدت ۴ روز انکوبه نمایید.

تست دکربوکسیلاز (روش مولر)

نتایج قابل انتظار:

نتیجه مثبت: تغییر رنگ به بنفش به علت شرایط قلیایی

نتیجه منفی: عدم تغییر رنگ

کنترل کیفی:

کنترل مثبت:

لیزین- کلبسیلا پنومونیه (ATCC 33495) تغییر رنگ در محدوده زرد تا بنفش

اورنیتین- انتروباکتر آئروژنز (ATCC 13048) تغییر رنگ در محدوده زرد تا بنفش

آرژنین- پسودوموناس آئروژینوزا (ATCC 27853) تغییر رنگ در محدوده زرد تا بنفش

کنترل منفی:

لیزین- سیتروباکتر فروندی (ATCC 331218) رزد

اورنیتین- پروتئوس ولگاریس (ATCC 6380) زرد

آرژنین- اشرشیاکلی (ATCC 25922) زرد

تست دکربوکسیلاز (روش مولر)

تست دکربوکسیلاز (روش مولر)

تست تشخیصی	نام محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدامات اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست دکربوکسیلاز	محیط دکوکسیلاز لیزین					کلبسیلا پنومونیه (کنترل مثبت)	۳۳۴۹۵							
						سیتروباکتر فروندی (کنترل منفی)	۳۳۱۲۱۸							
تست دکربوکسیلاز	محیط دکوکسیلازآرژنین					پسودوموناس آئروژینوزا (کنترل مثبت)	۲۷۸۵۳							
						اشرشیاکلی (کنترل منفی)	۲۹۹۲۲							
تست دکربوکسیلاز	محیط دکوکسیلاز اورنیتین					انتروباکتر آئروژنز (کنترل مثبت)	۱۳۰۴۸							
						پروتئوس ولگاریس (کنترل منفی)	۶۳۸۰							

بایل اسکولین آگار

- **هدف آزمایش:**

➢ از این تست برای شناسایی احتمالی انتروکوک ها و استرپتوکوک های گروه بویس استفاده می شود.

➢ برای افتراق انتروکوک ها و استرپتوکوک های گروه D از استرپتوکوک های ویریدانس غیر از گروه D نیز کاربرد دارد.

- **اساس آزمایش:**

➢ باکتری های گرم مثبت به جزء برخی از استرپتوکوک ها و انتروکوک ها، رشدشان در محیط دارای صفرا مهار می شود.

➢ ارگانیسم هایی که توانایی رشد در ۴٪ بایل را دارا هستند و اسکولین را به اسکولتین هیدرولیز می کنند، قادر رشد در این محیط هستند.

بایل اسکولین آگار

- **روش انجام**

➢ یک یا دو کلنی از باکتری را بر روی سطح شیبداری محیط بایل اسکولین تلقیح و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای 35°c تا 37°c در شرایط هوازی انکوبه نمایید.

- **نتایج قابل انتظار**

➢ نتیجه مثبت: رشد باکتری و سیاه شدن سطح شیبدار محیط کشت

➢ نتیجه منفی: رشد یا عدم رشد و عدم تغییر رنگ محیط کشت

بایل اسکولین آگار

- **کنترل کیفیت:**

➢ کنترل مثبت: انتروکوک فکالیس (ATCC 19433) رشد و تغییر رنگ محیط به سیاه

➢ کنترل منفی: اشرشیاکلی (ATCC 25922) رشد ولی عدم تغییر رنگ محیط

➢ کنترل منفی: استرپتوکوک پیوژن (ATCC 19615) عدم رشد و عدم تغییر رنگ محیط

- **محدودیت ها:**

➢ در اثر نیازهای تغذیه ای ممکن است در این محیط برخی از ارگانیسم ها فاقد رشد یا دارای رشد کند باشند.

بایل اسکولین آگار

بایل اسکولین آگار

تست تشخیصی	نام محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدام اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
بایل اسکولین	بایل اسکولین آگار					انتروکوک فکالیس (کنترل مثبت)	۱۹۴۳۳	رشد و تغییر رنگ محیط به سیاه						
						اشرشیاکلی (کنترل منفی)	۲۵۹۲۲	رشد ولی عدم تغییر رنگ محیط						
						استرپتوکوک پیوژن (کنترل منفی)	۱۹۶۱۵	عدم رشد و عدم تغییر رنگ محیط						

تست سیترات

- **هدف آزمایش:**

➢ برای شناسایی ارگانیسم هایی که از سیترات سدیم به عنوان تنها منبع کربن و از نمک معدنی آمونیوم به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده می کنند.

➢ این تست قسمتی از تست IMVIC است.

➢ باکتری هایی که آنزیم سیترات پرمئاز را دارند در این محیط رشد می کنند، این آزنزیم قادر است سیترات را به پیروات تبدیل کند و پیروات چرخه متابولیک را وادار به تولید انرژی می کند.

➢ باکتری هایی قادر به رشد در این محیط هستند که سیترات را مصرف و و آمونیوم فسفات را به آمونیاک تبدیل کنند، در نتیجه تغییرات PH قلیایی می شود و رنگ محیط با اندیکاتور بروموتیمول بلو از سبز به آبی تغییر می کند.

تست سیترات

- **روش انجام:**

- کلنی مورد نظر را با یک آنس استریل از کشت تازه برداشته و به سطح شیبدار محیط سیمون سیترات تلقیح نمایید.
- باکتری به قسمت انتهایی محیط وارد نشود، همچنین از محیط مایع تلقیح انجام ندهید چون میزان باکتری زیاد می شود.
- محیط را به مدت ۷ روز در دمای 35°C تا 37°C انکوبه نمایید. و در نهایت رشد باکتری و تغییر رنگ محیط را بررسی نمایید.

تست سیترات

- **نتایج مورد انتظار:**

➢ **نتیجه مثبت**: رشد در محیط سیمون سیترات با یا بدون تغییر رنگ، تغییر رنگ از سبز به آبی به دلیل قلیایی شدن محیط

➢ **نتیجه منفی**: عدم رشد باکتری در محیط

- **محدودیت:**

برخی از ارگانیسم ها قادر به رشد در محیط بدون تغییر رنگ هستند که در کار تشخیص تداخل ایجاد می کنند و به بررسی گسترده تر در موارد رشد بدون تغییر رنگ نیاز است.

تست سیترات

- **کنترل کیفیت:**

➢ **کنترل مثبت:** انتروباکتر آئروژنز (ATCC 13048) رشد و تغییر رنگ به آبی

➢ **کنترل منفی**: اشرشیاکلی (ATCC 25922) عدم رشد و عدم تغییر رنگ

تست سیترات

Result Interpretation on Simmons Citrate Agar
Negative
Positive
Simmons Citrate Agar
uncultivated(left); cultivated Enterococcus(right)

Simmons Citrate
A
B
C
A: Positive…Enterobacter
B: Negative…E. coli
C: Control-uninoculated
SevenLab.ir

تست سیترات

تست تشخیصی	نام محیط	مشخصات فیزیکی	تاریخ انقضاء	سری ساخت	نام تولید کننده	ارگانیسم کنترل	شماره ATCC	نتیجه مورد انتظار	نتیجه مشاهده شده	اقدامات اصلاحی	نتیجه نهایی	دفعات انجام آزمایش	نام فرد انجام دهنده	تاریخ انجام
تست سیترات	محیط سیمون سیترات					انتروباکتر آئروژنز(کنترل مثبت)	۱۳۰۴۸	رشد و تغییر رنگ به آبی						
						اشرشیاکلی (کنترل منفی)	۲۵۹۲۲	عدم رشد و عدم تغییر رنگ						

کنترل کیفیت آنتی سرم های تشخیصی مثل شیگلا

- دفعات کنترل کیفیت، هر سری ساخت و خرید و سپس هر ۶ ماه یکبار
- **بررسی چشمی در هر بار استفاده**: یک قطره از آنتی سرم را روی لام بریزید و در زیر نور کافی بررسی نمایید، آنتی سرم باید کاملا شفاف و فاقد هر گونه ذره باشد و در غیر این صورت نباید از آن استفاده شود.
- بررسی خصوصیات و شدت آگلوتیناسیون آنتی سرم: آزمایش حداقل یک سویه کنترل مثبت و یک سویه کنترل منفی
- **توجه**: آزمون کنترل کیفیت آنتی سرم با سویه های کنترل باید مطابق روش انجام آزمایش و کاملا منطبق با دستورالعمل شرکت سازنده باشد.

کنترل کیفیت آنتی سرم های تشخیصی مثل شیگلا

- **روش انجام آزمایش (روش آگلوتیناسیون)**

- یک قطره آنتی سرم (حدود ml۰.۰۵ ، اگر چه می توان ۱۰ µl هم استفاده نمود) روی لام قرار دهید.
- یک قطره سرم فیزیولوی روی طرف دیگر قرار دهید، برای بررسی آگلوتیناسیون یا خشن بودن کلنی ها (به عنوان کنترل منفی)
- از کلنی های خالص ۱۸ تا ۲۴ ساعته سویه کنترل روی محیط غیر انتخابی مانند بلاد آگار یا TSA، سوسپانسیون یکنواخت حدود ۲ تا ۳ مک فارلند در هر قطره تهیه نمایید. و با اپلیکاتور چوبی یا لوپ آنرا کاملا مخلوط کنید.

کنترل کیفیت آنتی سرم های تشخیصی مثل شیگلا

- لام را به مدت ۳۰ ثانیه یا ۱ دقیقه (مطابق دستورالعمل همراه آنتی سرم) به عقب و جلو بچرخانید.

- **تفسیر:**

- واکنش آگلوتیناسیون را در زیر نور کافی (چراغ مطالعه)با پس زمینه تیره بررسی نمایید.
- قطره سرم فیزیولوژی بای فاقد آگلوتیناسیون باشد، تا نتیجه قطرع آنتی سرم قابل اطمینان محسوب شود.

شدت آگلوتیناسیون را قرائت نمایید.

- نتایج همه واکنش ها در زمان تعیین شده در دستورالعمل همراه (بروشور) ثبت نمایید.
- شدت آگلوتیناسیون را می توانید از ۱+ تا ۴+ گزارش نمایید، حالتی که ۴+ گزارش می شود همه میکرروارگانیسم ها کلامپ شده است و سوپرناتانت کاملا شفاف است.

کنترل کیفیت آنتی سرم های تشخیصی مثل شیگلا

- در حالت ۳+ حدود ۷۵٪ ارگانیسم ها آگلوتینه شده است و سوپرناتانت کمی کدر است. در حالتی که شدت آگلوتیناسیون ۲+ است ۵۰٪ ارگانیسم آگلوتینه داده است و سوپرناتانت نسبتا کدر است.
- در واکنش ۱+ حدود ۲۵٪ آگلوتینه مشاهده می شود و سوپرناتانت کدر است.
- در حالت Trace آگلوتنیه کمتر از ۱+ مشاهده می شود و در حالت Negative هیچ آگلوتینه ای مشاهده نمی شود.
- نتایج کنترل کیفیت باید در فرم های QC ثبت شود.

کنترل کیفیت آنتی سرم های تشخیصی مثل شیگلا

سویه کنترل	Group A شدت/مدت آگلوتیناسیون	Group B شدت/مدت آگلوتیناسیون	Group C شدت/مدت آگلوتیناسیون	Group D شدت/مدت آگلوتیناسیون
Sh.dysenteriae	+/30 S	-/30 S	-/30 S	-/30 S
Sh.flexneri 12022	-/30 S	+/30 S	-/30 S	-/30 S
Sh.boydii	-/30 S	-/30 S	+/30 S	-/30 S
Sh.Sinnei 9290	-/30 S	-/30 S	-/30 S	+/30 S
نتیجه نهایی	قابل قبول	قابل قبول	قابل قبول	قابل قبول

کنترل کیفیت آنتی سرم های تشخیصی مثل شیگلا

- نام شرکت سازنده، شماره ساخت، تاریخ انقضاء، تاریخ انجام آزمایش و نام فرد انجام دهنده در جدول ثبت شود.
- در جدول ۴ آنتی سرم شیگلا را مشاهده می کنید، که از ۴ سویه شیگلا جهت کنترل کیفی آنتی سرم ها استفاده شده است.
- هر آنتی سرم باید با یک سویه کنترل مثبت و یک سویه کنترل منفی بررسی شود و لازم نیست از ۳ سویه کنترل منفی استفاده شود، بلکه یک سویه هم کافی است، بنابراین سویه منفی می تواند شیگلافلکسنری یا بویدی یا سونه ای باشد و یک از آنها کافی است.
- اگر بروشور سازنده آنتی سرم توصیه می کند آگلوتیناسیون ظرف مدت ۳۰ ثانیه بررسی شود می بایست طی مدت ۳۰ ثانیه نتیجه ثبت شود.