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

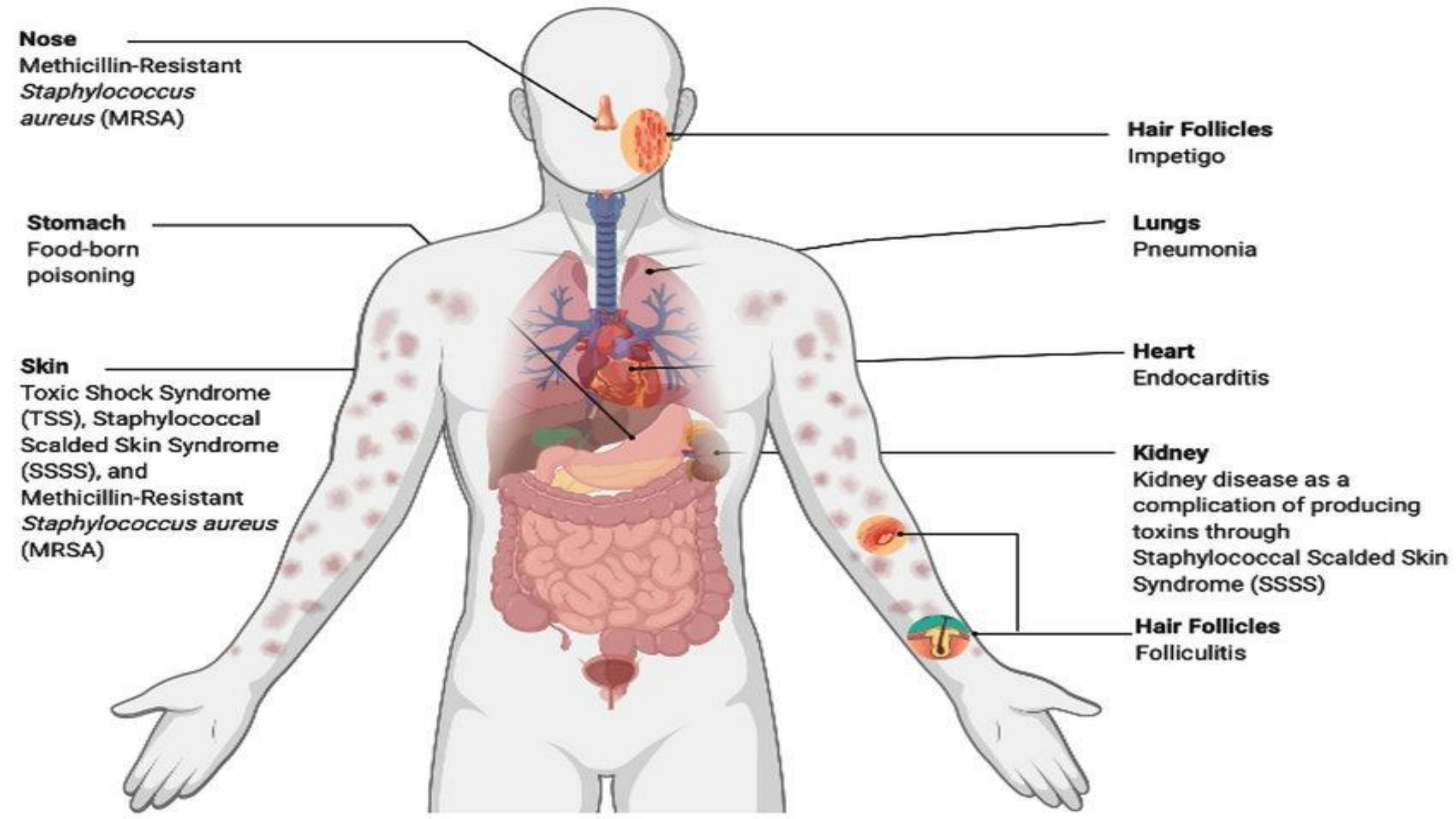
آزمایشگاه باکتری شناسی ۱

1

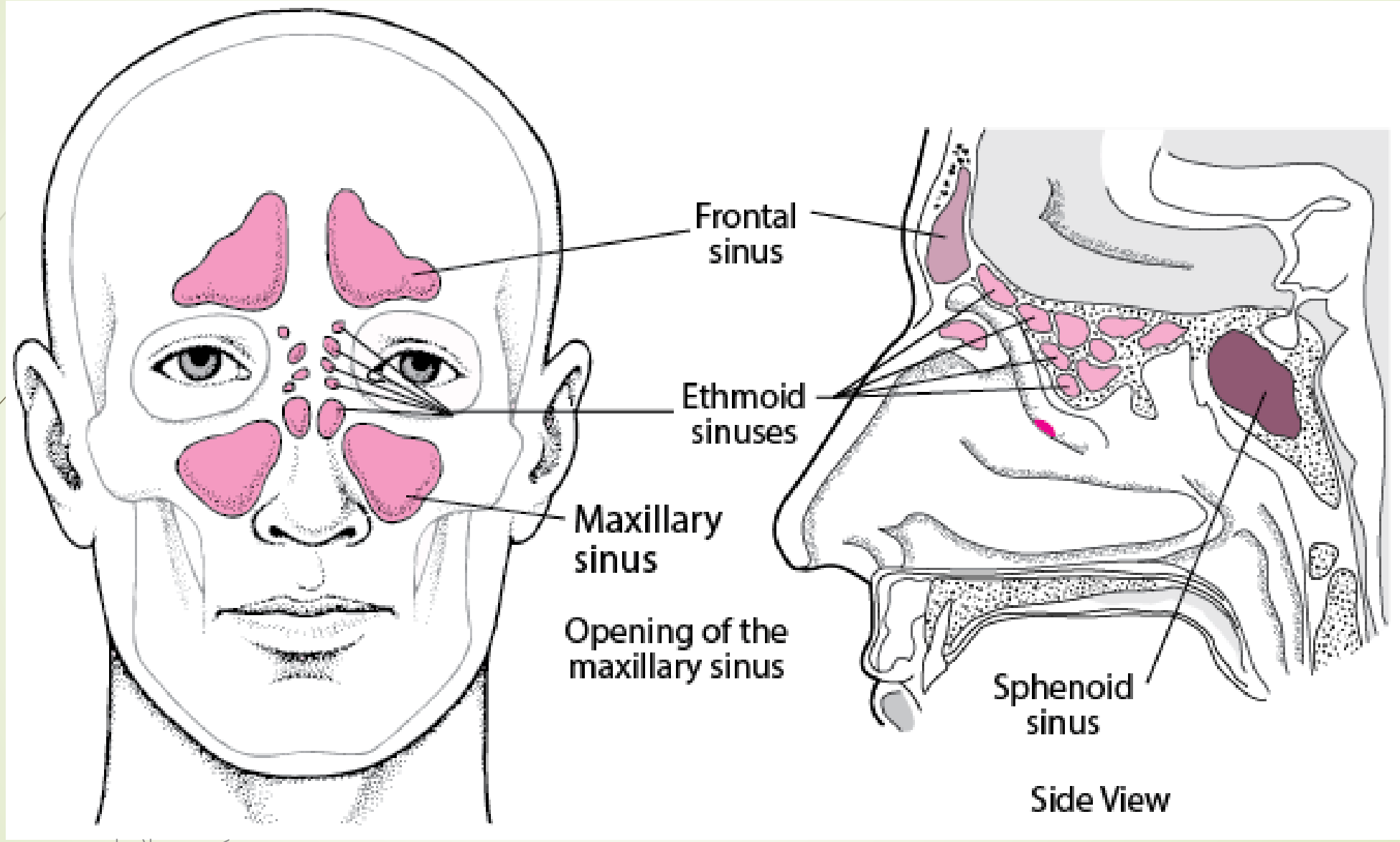
نمونه گیری از بینی به منظور جداسازی استافیلوکوکسی ساکن در بینی و کشت نمونه ها بر روی محیط Baird parker agar

تهیه کننده:سهیلا عباسی

- استافیلوکوکوس آرئوس یکی ازشایع ترین عوامل مؤثر در عفونت های پوستی و سیستمیک می باشد.
- به طور طبیعی بیش از ۳۰ درصد افراد، ناقل این باکتری در پوست و بینی خویش می باشند.
- افزایش روز افزون مقاومت داروئی در این باکتری ها و به تبع آن، گسترش عفونت های ناشی از آن، توجه مجامع علمی را معطوف به خود نموده است.


Nose
Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
Stomach
Food-born poisoning
Skin
Toxic Shock Syndrome (TSS), Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS), and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
Hair Follicles
Impetigo
Lungs
Pneumonia
Heart
Endocarditis
Kidney
Kidney disease as a complication of producing toxins through Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS)
Hair Follicles
Folliculitis

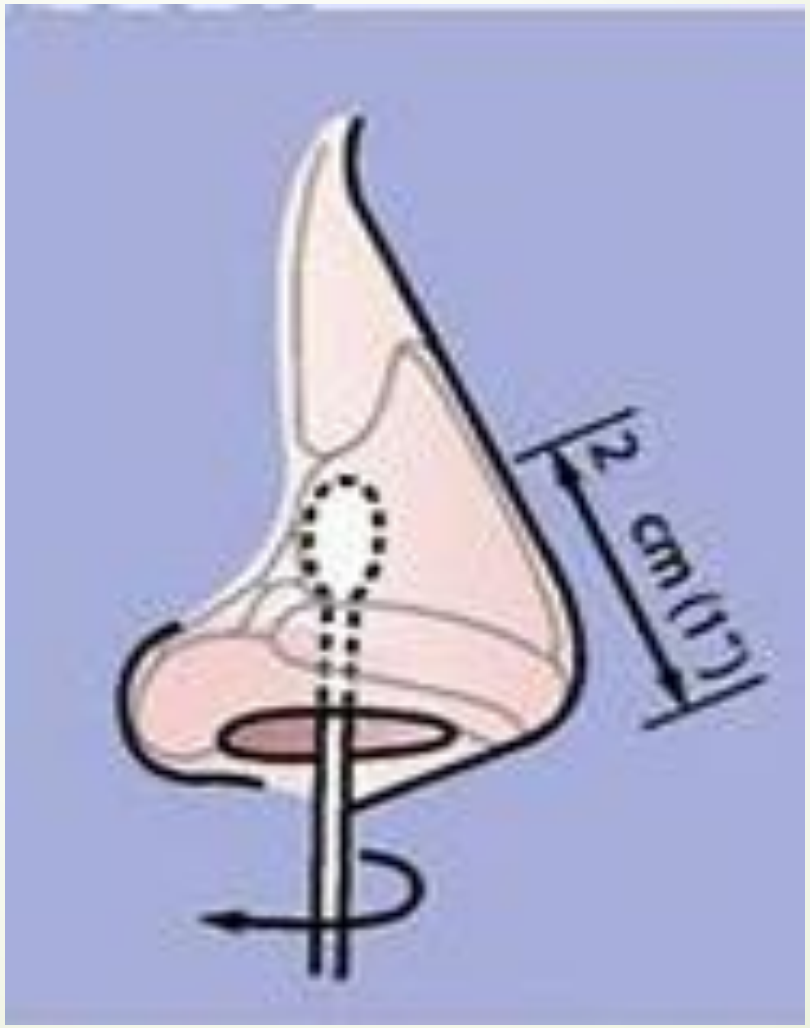
nasal swab
for culture


Frontal sinus
Ethmoid sinuses
Maxillary sinus
Opening of the maxillary sinus
Sphenoid sinus
Side View

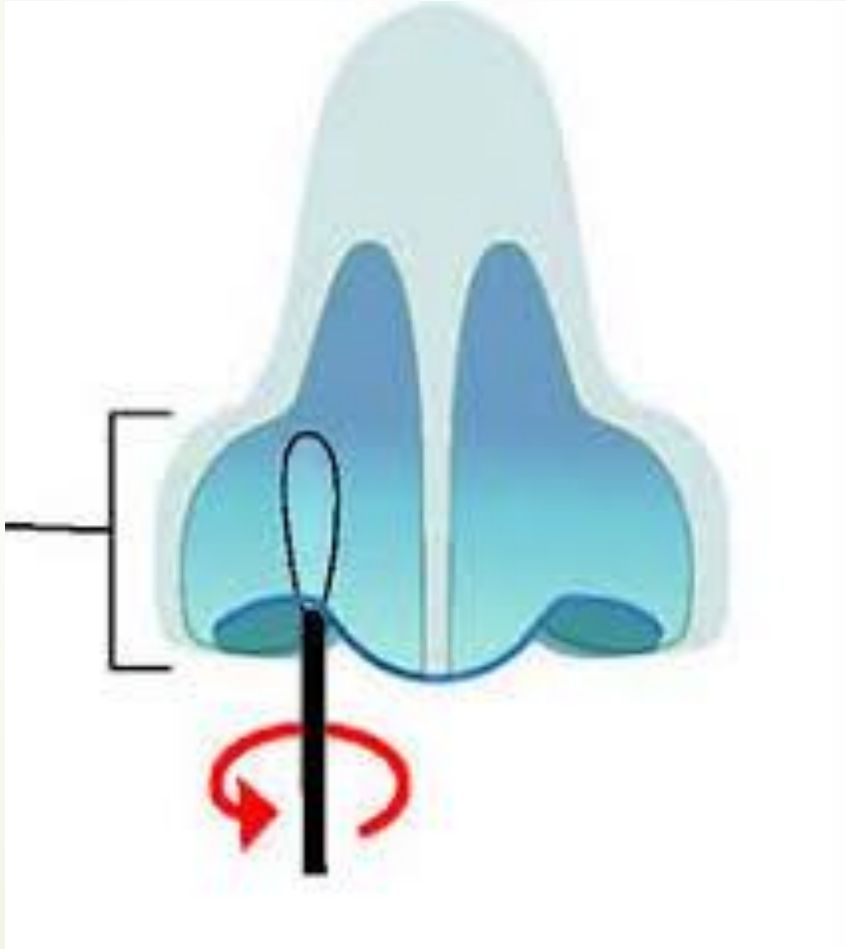
Culture Protocol

- All patient's nares were cultured preoperatively using the *Oxoid Penicillin Binding Protein Latex* agglutination test before the patient skin was prepped in the operating room.
  - This screening test selects for *S.aureus* and reports both methicillin sensitive and resistant strains
- After the nasal culture was obtained, each patient received an intranasal mupirocin application to each nares
- The mupirocin application was continued every 12 hours until the culture results were available.
  - If the culture returned positive for *S. aureus*, mupirocin was continued for a total of 14 doses
  - If the culture returned negative, mupirocin was stopped

محل دقیق نمونه گیری از بینی



محل دقیق نمونه گیری از بینی



- دو ماده شیمیایی سمی و انتخابی که اغلب در محیط های کشت استافیلوکوکس آرئوس به کار می روند، کلرورسدیم و تلوریت پتاسیم می باشند که از غلظت های مختلف آن استفاده می گردد.
- این غلظت ها از مقادیر۵/۵ درصد تا ۱۰ درصد برای کلرورسدیم و از ۰/۰۰۲۵ درصد تا ۰/۰۵ درصد جهت تلوریت پتاسیم متغیر می باشد.

- سایر موارد شیمیایی مانند سولفات آمونیوم، اسید سوربیک، گلیسیرین، کلرورلیتیوم و پلی میکسین غالبا همراه با کلرورسدیم و تلوریت پتاسیم به محیط اضافه می شوند.
- سدیم آزید به تنهایی یا همراه با کلرورسدیم و نئومایسین در محیط های کشت انتخابی جهت جداسازی به کار می روند.
- محیط ها ی کشت حاوی عوامل انتخابی مشخص با غلظت های مشابه از نظر pH با یکدیگر اختلاف دارند. سایر اختلافاتی که در محیط های کشت وجود دارند مربوط به تجمع و اختلاط عوامل انتخابی و یا تفاوت در ترکیب اشکال تشخیص هستند.

صور تشخیصی اساسی که در محیط کشت جداسازی استافیلوکوکسی از آن ها استفاده می شود شامل موارد زیر می باشند:

1. توانایی استافیلوکوکس آرئوس جهت رشد در حضور غلظت ۷.۵ تا ۱۰ درصد کلروسدیم.
2. توانایی استافیلوکوکس آرئوس جهت رشد در حضور ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ درصد تلوریت پتاسیم همراه با ۰/۲ تا ۰/۵ درصد کلرورلیتیوم و ۰/۱۲ تا ۱/۲۶ درصد گلیسین یا ۴۰ میکروگرم در هر میلی لیتر پلی میکسین.
3. توانایی استافیلوکوکوس آرئوس جهت احیا تلوریت پتاسیم و ایجاد کلنی های سیاهرنگ
4. شکل کلنی و میکروسکوپی میکروارگانیسم
5. رنگی شدن کلنی های باکتری بر حسب نوع محیط کشت
6. فعالیت کواگولاز و تولید اسید در محیط کشت جامد
7. توانایی استافیلوکوکس آرئوس جهت هیدرولیز تخم مرغ یا DNA
8. جهت تشخیص استافیلوکوکس آرئوس غالبا آزمایش تائیدی که آزمون کواگولاز است مورد استفاده قرار می گیرد.

Baird parker agar

- این محیط حاوی کلرورلیتیوم و تلوریت پتاسیم جهت مهار شدن رشد فلور میکروبی همراه می باشد.
- در حالیکه مواد دیگر موجود در این محیط کشت مانند پیروات و گلایسین به طور انتخابی رشد استافیلوکوک ها را تحریک می کند.

- کلنی های باکتری استافیلوکوکس هنگامی که بر روی این محیط کدر (کدر به علت موجود بودن زرده تخم مرغ در داخل محیط کشت) رشد می کنند دو خصوصیت مشخص را نشان می دهد.
- الف) هاله ها و حلقه های مشخص در نتیجه عمل لیپولیز و پروتئولیز تشکیل خواهد شد (نشان دهنده ی عمل لیپاز باکتری استافیلوکوک).
- ب) احیای تلوریت به تلوریوم و ایجاد کلنی های به رنگ سیاه رنگ.

- واکنش زرده تخم مرغ و احیاء تلوریت و در نتیجه ایجاد کلنی های سیاه رنگ با هاله شفاف در اطراف خود نشان دهنده رشد باکتری استافیلوکوکس است و بعد از شمارش کلنی های سیاهرنگ مقدار باکتری را در نمونه حساب کنید.
- برای اطمینان از جدا شدن باکتری استافیلوکوکس آرئوس اقدام به انجام تست کواگولاز به هر دو روش لامی و لوله ای مطابق با روش ذکر شده در قسمت تست کواگولاز نمایید.

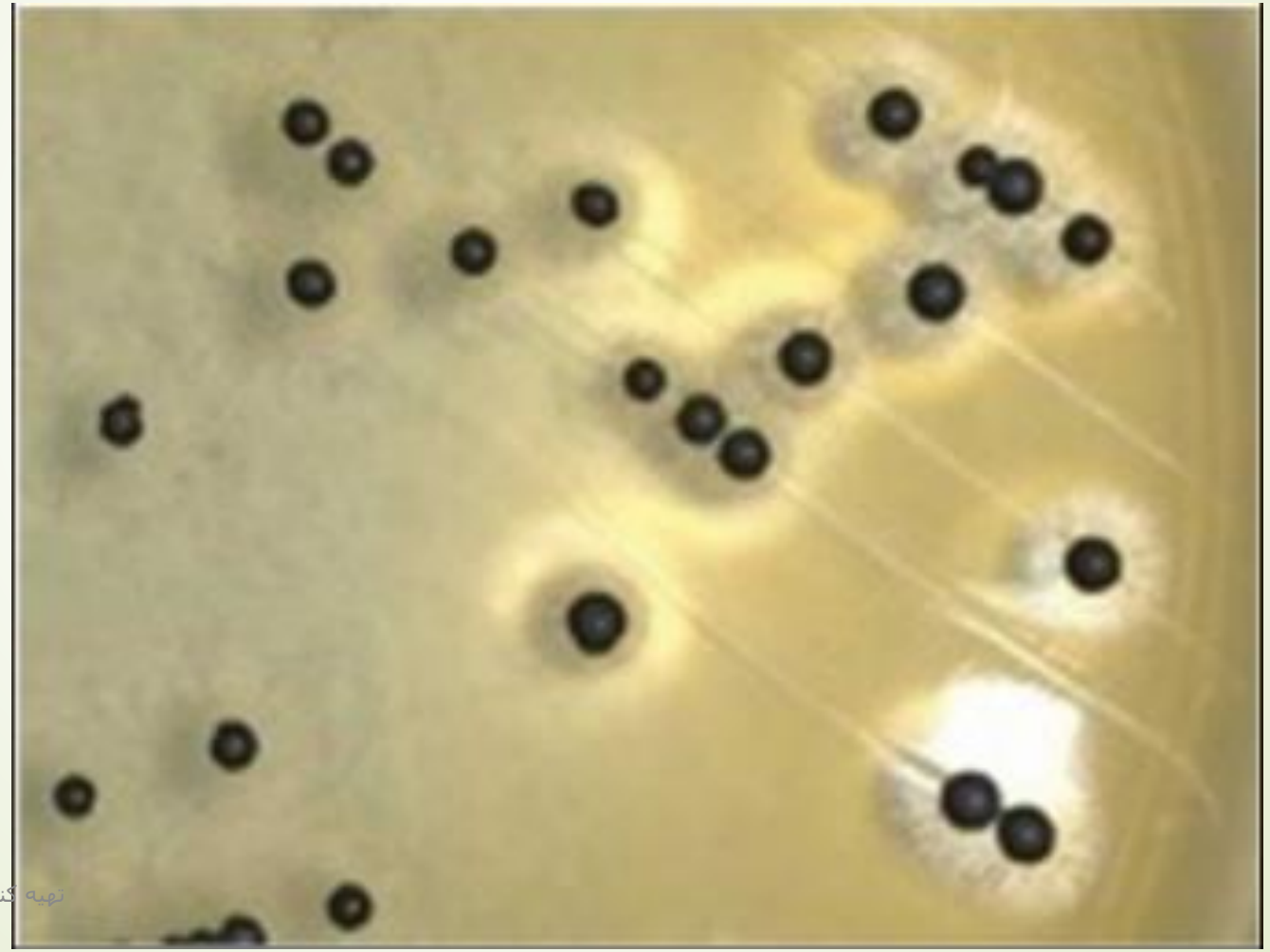
کلنی استافیلوکوکوس بر روی محیط بردپارکر

کلنی استافیلوکوکوس بر روی محیط بردپارکر

کلنی استافیلوکوکوس بر روی محیط بردپارکر

کلنی استافیلوکوکوس بر روی محیط بردپارکر

کلنی استافیلوکوکوس بر روی محیط بردپارکر



- در بین جنس های مختلف از کوکسی های گرم مثبت ، ۳ جنس دارای اهمیت بالینی هستند : استافیلوکوکوس ، استرپتوکوکوس و انتروکوکوس.
- جنس استافیلوکوکوس در شاخه ی فیرمی کوتس و در خانواده استافیلوکوکاسه قرار دارد. بسیاری از گونه های این جنس جز فلور بوده و اهمیت بالینی ندارند. در این جنس ۵ گونه ی زیر دارای اهمیت بالینی هستند :

- *استافیلوکوکوس ارئوس (S.aureus)*
- *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس(S.epidermidis)*
- *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس(S.saprophyticus)*
- *استافیلوکوکوس همولیتیکوس (S.haemolyticus)*
- *استافیلوکوکوس لوگدونسیس(S.lugdunensis)*

استافیلوکوک ها کوکسی های گرم مثبتی هستند که به صورت تکی ، دیپلوکوک(دوتایی)، تتراد(چهارتایی)، زنجیره های کوتاه، یا بصورت دسته های نامنظم و خوشه ای دیده می شوند.

آرایش خوشه انگوری اغلب مربوط به استافیلوکوک ها است.
استافیلوکوک ها معمولا بی هوازی اختیاری هستند اما برخی گونه های آنها بی هوازی مطلق هستند.

فاقد تحرک و فاقد اسپور و معمولا فاقد کپسول هستند.کاتالاز آنها مثبت است و معمولا از این تست برای تمایز استافیلوکوک ها از استرپتوکوک ها که کاتالاز منفی هستند ، استفاده می شود .
تست اکسیداز اصلاح شده ، در استافیلوکوک ها معمولا منفی است.
تمامی استافیلوکوک ها به خوبی بر روی بلاد آگار رشد می کنند.

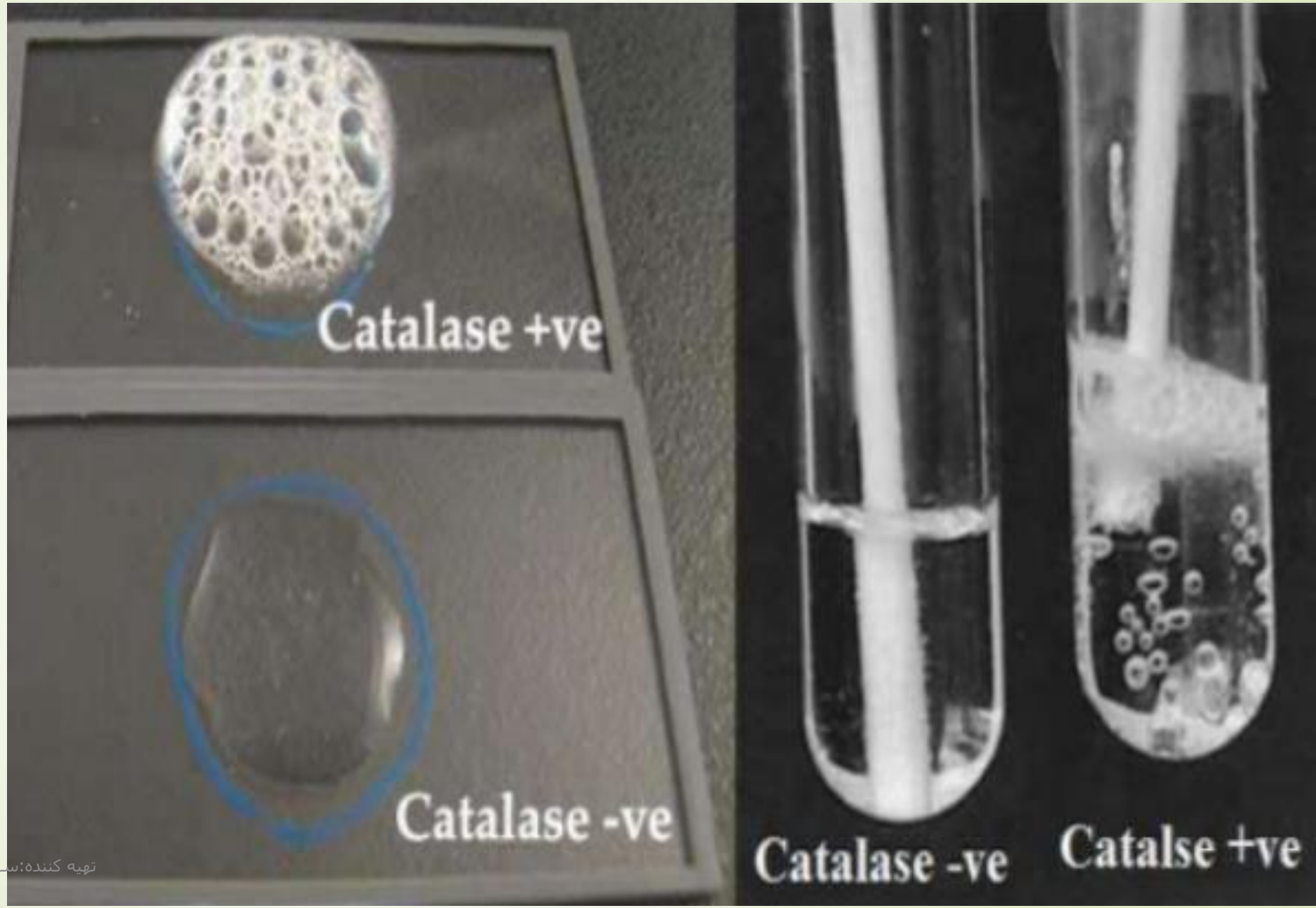
Procedure of catalase test

Tube Method

- Pour 1-2 ml of hydrogen peroxide solution into a test tube.
- Using a sterile wooden stick or a glass rod, take several colonies of the 18 to 24 hours test organism and immerse in the hydrogen peroxide solution.
- Observe for immediate bubbling.

Slide Method

- Use a loop or sterile wooden stick to transfer a small amount of colony growth in the surface of a clean, dry glass slide.
- Place a drop of 3% H_2O_2 in the glass slide.
- Observe for the evolution of oxygen bubbles.


Catalase +ve
Catalase -ve
Catalase -ve
Catalse +ve

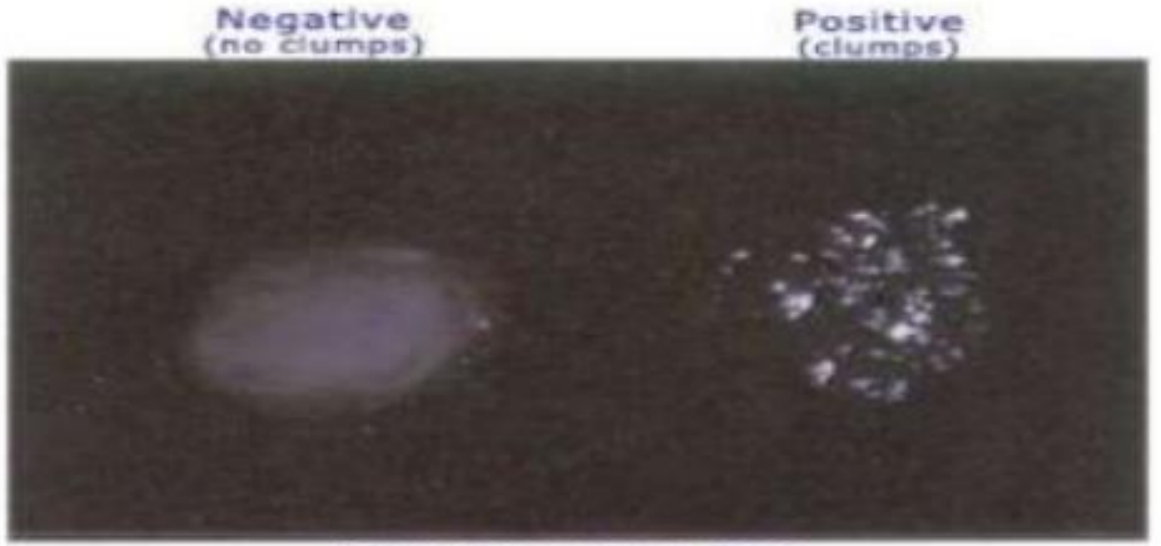
Procedure and Types of Coagulase Test

Slide Test (to detect bound coagulase)

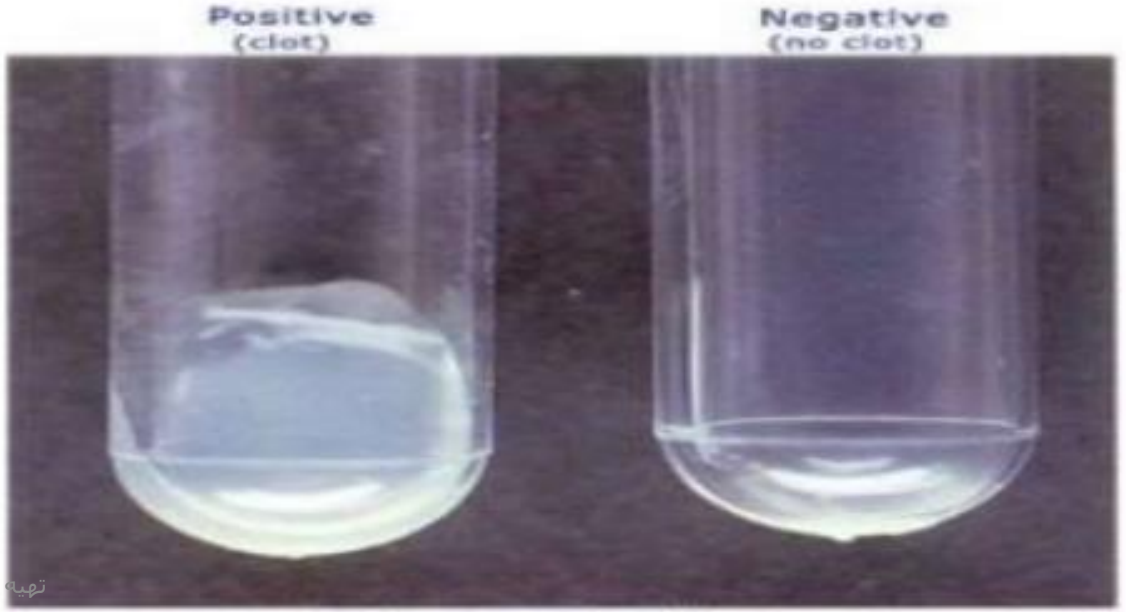
- Place a drop of physiological saline on each end of a slide, or on two separate slides.
- With the loop, straight wire or wooden stick, emulsify a portion of the isolated colony in each drop to make two thick suspensions.
- Add a drop of human or rabbit plasma to one of the suspensions, and mix gently.
- Look for clumping of the organisms within 10 seconds.
- No plasma is added to the second suspension to differentiate any granular appearance of the organism from true coagulase clumping.

Tube Test (to detect free coagulase)

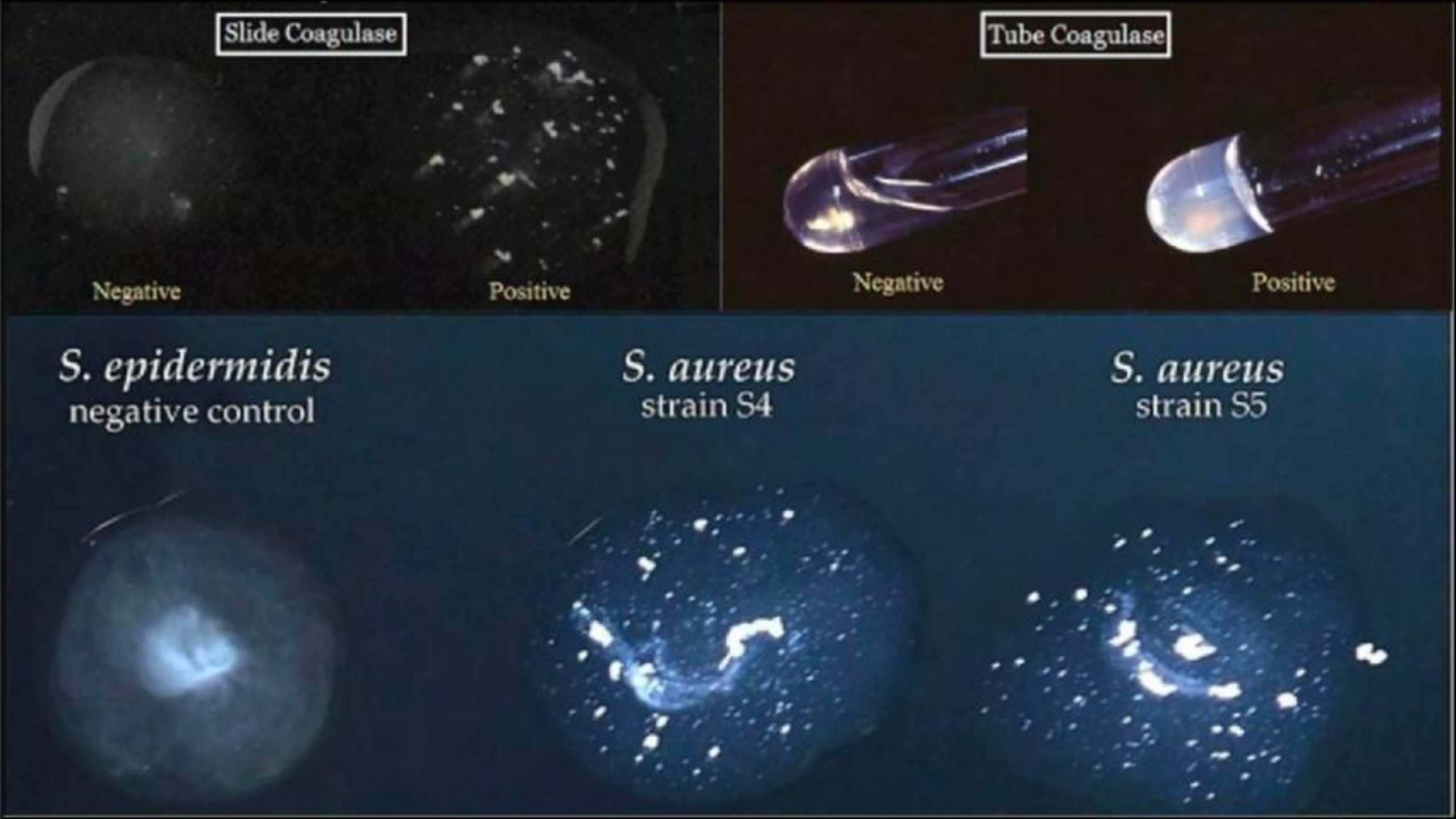
- Dilute the plasma 1 in 10 in physiological saline (mix 0.2 ml of plasma with 1.8 ml of saline).
- Take 3 small test tubes and label as T (Test), P (Positive Control) and N (Negative Control). Test is 18-24 hour broth culture, Positive control is 18-24 hr S. aureus broth culture and Negative control is sterile broth.
- Pipette 0.5 ml of the diluted plasma into each tube.
- Add 5 drops (0.1 ml) of the Test organisms to the tube labeled “T”, 5 drops of S. aureus culture to the tube labeled “P” and 5 drops of sterile broth to the tube labeled “N”.
- 32
- After mixing, incubate the three tubes at 35-37 Degree Celsius.
- Examine for clotting after 1 hours. If no clotting has occurred, examine at 30 minutes intervals for up to 6 hours.



Slide Coagulase Test

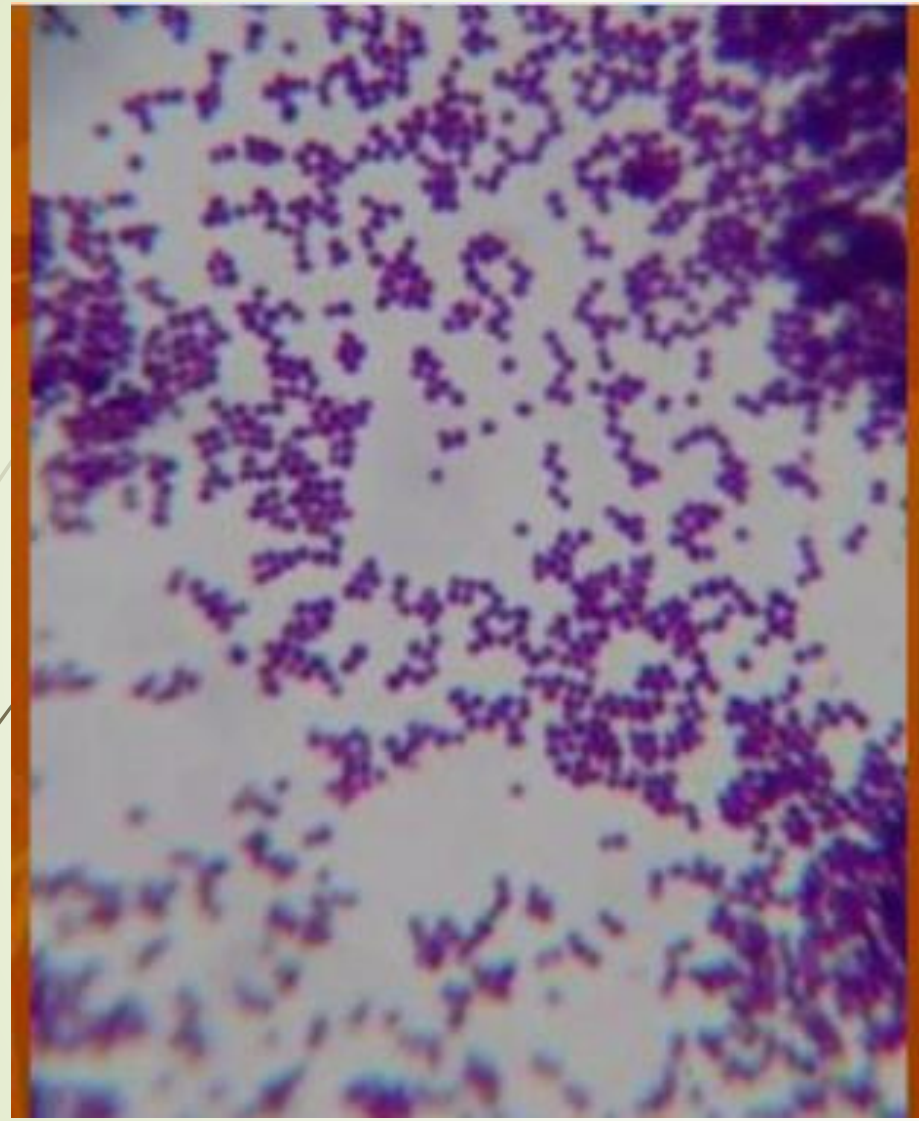


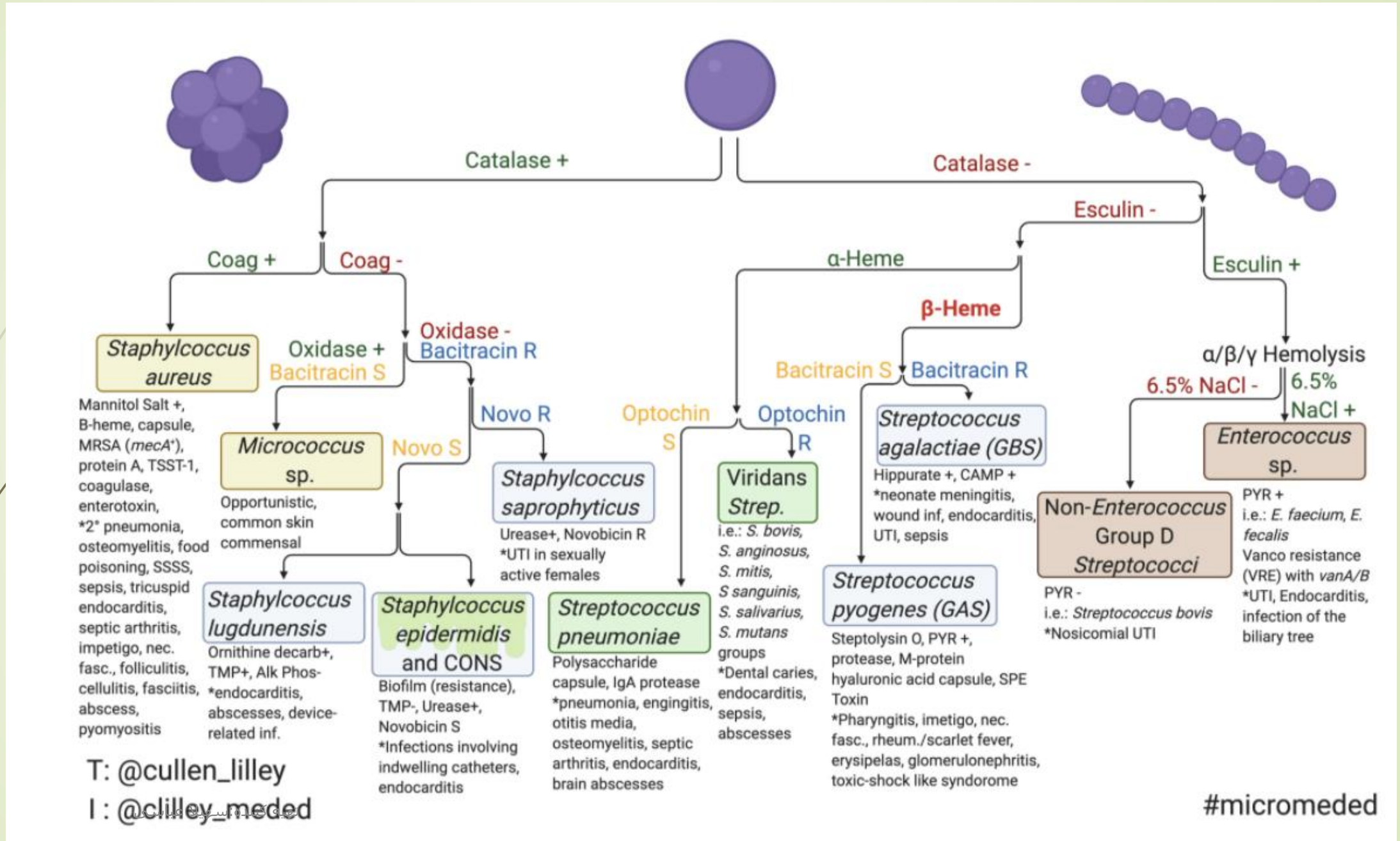
Tube Coagulase Test

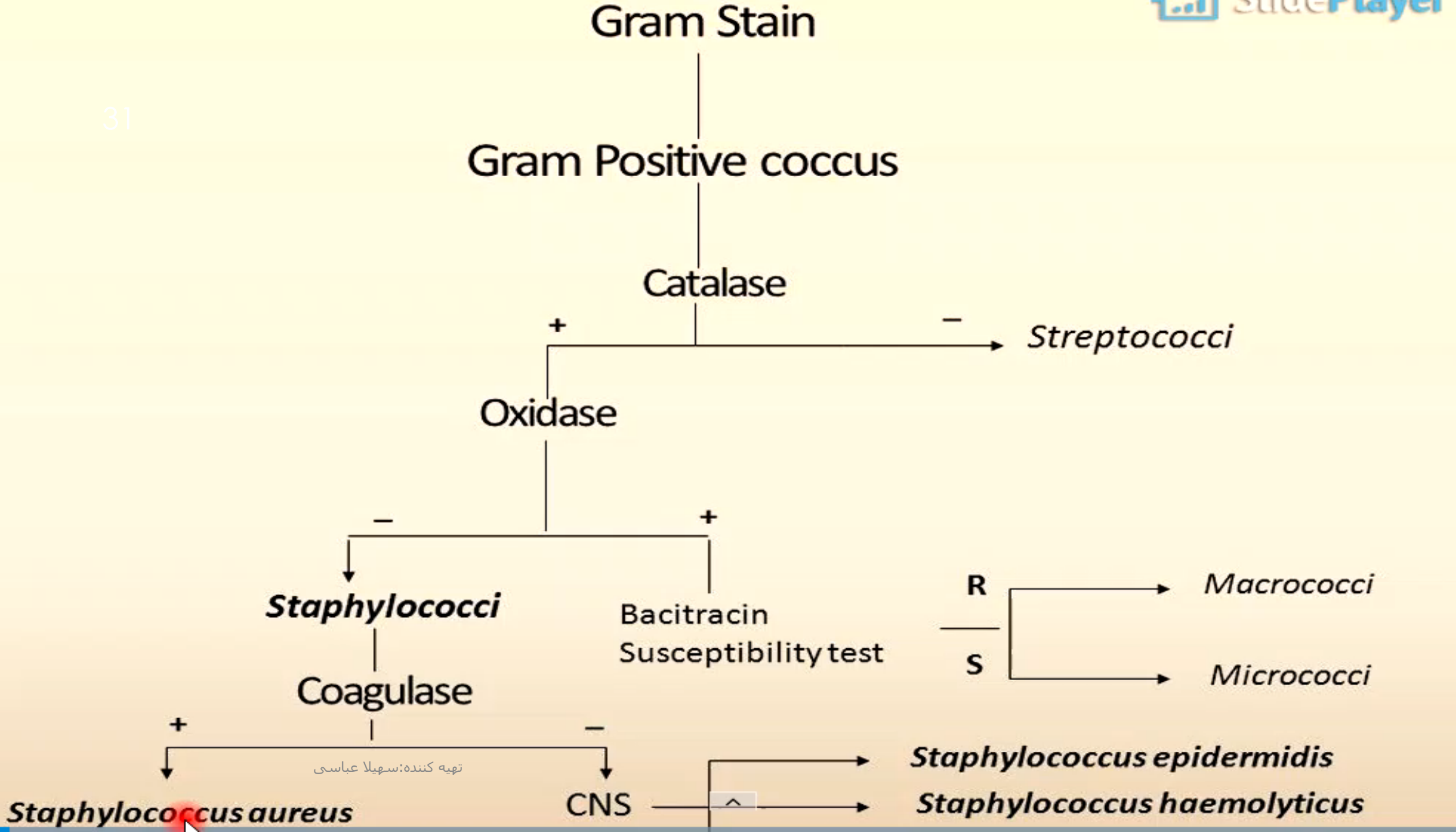

Slide Coagulase
Negative
Positive
Tube Coagulase
Negative
Positive
S. epidermidis
negative control
S. aureus
strain S4
S. aureus
strain S5

- Culture – specimens are plated on
  1. NA - golden yellow colony
  2. BA – hemolytic colonies
  3. Selective media – Ludlam's media, Mannitol salt agar (MSA)

MSA




Catalase +
Catalase -
Coag +
Coag -
Esculin -
Esculin +
α-Heme
β-Heme
Oxidase +
Bacitracin S
Oxidase -
Bacitracin R
Novo S
Novo R
Optochin S
Optochin R
Bacitracin S
Bacitracin R
6.5% NaCl -
6.5% NaCl +
α/β/γ Hemolysis
Staphylcoccus aureus
Mannitol Salt +, B-heme, capsule, MRSA (mecA+), protein A, TSST-1, coagulase, enterotoxin, *2° pneumonia, osteomyelitis, food poisoning, SSSS, sepsis, tricuspid endocarditis, septic arthritis, impetigo, nec. fasc., folliculitis, cellulitis, fasciitis, abscess, pyomyositis
Micrococcus sp.
Opportunistic, common skin commensal
Staphylcoccus saprophyticus
Urease+, Novobicin R
*UTI in sexually active females
Staphylcoccus lugdunensis
Ornithine decarb+, TMP+, Alk Phos-
*endocarditis, abscesses, device-related inf.
Staphylcoccus epidermidis and CONS
Biofilm (resistance), TMP-, Urease+, Novobicin S
*Infections involving indwelling catheters, endocarditis
Streptococcus pneumoniae
Polysaccharide capsule, IgA protease
*pneumonia, engingitis, otitis media, osteomyelitis, septic arthritis, endocarditis, brain abscesses
Viridans Strep.
i.e.: S. bovis, S. anginosus, S. mitis, S sanguinis, S. salivarius, S. mutans groups
*Dental caries, endocarditis, sepsis, abscesses
Streptococcus agalactiae (GBS)
Hippurate +, CAMP +
*neonate meningitis, wound inf, endocarditis, UTI, sepsis
Streptococcus pyogenes (GAS)
Steptolysin O, PYR +, protease, M-protein hyaluronic acid capsule, SPE Toxin
*Pharyngitis, imetigo, nec. fasc., rheum./scarlet fever, erysipelas, glomerulonephritis, toxic-shock like syndorome
Non-Enterococcus Group D Streptococci
PYR -
i.e.: Streptococcus bovis
*Nosicomial UTI
Enterococcus sp.
PYR +
i.e.: E. faecium, E. fecalis
Vanco resistance (VRE) with vanA/B
*UTI, Endocarditis, infection of the biliary tree
T: @cullen_lilley
I : @clilley_meded
#micromeded


Gram Stain
Gram Positive coccus
Catalase
+
–
Streptococci
Oxidase
–
+
Staphylococci
Bacitracin
Susceptibility test
R
S
Macrococci
Micrococci
Coagulase
+
–
تهیه کننده:سهیلا عباسی
Staphylococcus aureus
CNS
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus haemolyticus

روش شناسایی:

۱) تمایز استافیلوکوک و استرپتوکوک:

a. تست کاتالاز: با انجام این تست می توان بین کوکسی های کاتالاز مثبت (استافیلوکوک و میکروکوکوس) و کوکسی های کاتالاز منفی (استرپتوکوک و انتروکوک) تمایز قایل شد. برای انجام تست، کلونی باکتری را بر روی یک لام شیشه ای قرار داده و بر روی آن یک قطره محلول پراکسیدهیدروژن ۳٪ بریزید. تشکیل بلافاصله حباب های اکسیژن، نشان دهنده این است که باکتری کاتالاز تولید می کند. در صورتی که بعد از ۲۰ ثانیه حبابی تشکیل نشود یا حباب ضعیفی مشاهده شود نتیجه تست را منفی گزارش کنید. ذکر این نکته ضروری است که برای انجام این تست از کلونی های رشد یافته بر روی محیط بلادآگار، به دلیل ایجاد واکنش مثبت کاذب اجتناب کنید.

۲) تمایز استافیلوکوک.و میکروکوک :

تمامی کوکسی های گرم مثبت و کاتالاز مثبت جداسازی شده از نمونه های بالینی، استافیلوکوکوس نیستند. جنس میکروکوکوس از نظر خصوصیات موفولوژیکی و کاتالاز، با استافیلوکوک ها مشابهت دارد. میکروکوکها هوازی هستند در حالیکه استافیلوکوکها بی هوازی اختیاری هستند. میکروکوکها آرایش جفتی، تتراد و خوشه های نامنظم دارند و جز فلور پوست، غشاهای مخاطی و ناحیه حلق-دهان (oropharynx) می باشند. میکروکوک ها اغلب به عنوان آلوده کننده نمونه بالینی در نظر گرفته می شوند و تنها در افراد دارای نقص سیستم ایمنی می توانند عفونت ایجاد کنند. بیشترین گونه جداسازی شونده، میکروکوکوس لوتئوس (*Micrococcus luteus*) است که دارای کلونی های زرد لیموئی روشن است. این باکتری در موارد نادر در اندوکاردیت، مننژیت، پنومونی و آرتریت چرکی (التهاب مفاصل چرکی) نقش دارد. برای تمایز میکروکوکها از استافیلوکوکها می توان از تست های زیر استفاده کرد:

a) تست اکسیداز اصلاح شده یا تست میکروداز: (Modified oxidase test- Microdase test)

این تست تنها برای کوکسی های گرم مثبت و کاتالاز مثبت است. در واقع تست اکسیدازی که برای میکروکوکوس و استافیلوکوکوس به کار میرود، یک تست اکسیداز تغییر یافته است. در این تست، معرف اکسیداز (تترامتیل-پارا-فنیلن-دی آمین دی هیدروکلراید) را در دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل میکنند. این کار باعث میشود معرف اکسیداز راحتتر از دیواره عبور کند و وارد سلول شود. روش انجام این تست مشابه تست اکسیداز معمولی است. برای این کار مقداری از کلونی باکتری را بر روی دیسک میکروداز می کشند. تشکیل رنگ آبی- ارغوانی در عرض ۳۰ ثانیه نشان دهنده مثبت بودن تست است. رنگ ارغوانی در نتیجه تشکیل اندوفنول حاصل از اکسیداسیون معرف اکسیداز می باشد.

b) تست حساسیت به باسیتراسین: (Susceptibility to bacitracin)

باسیتراسین یک آنتی بیوتیک تولید شده توسط باسیلوس سوبتیلیس است. حساسیت به آن می تواند توسط دیسک های حاوی ۰,۰۴ واحد باسیتراسین تعیین شود. دیسک به آرامی بر روی سطح بلادآگار تلقیح شده با باکتری مورد نظر، فشار داده می شود. سپس پلیت به صورت شبانه انکوبه می شود. در صورتی که قطر هاله مهاری بیش از ۱۰ میلی متر باشد (10≤ mm) باکتری به آن حساس است. استافیلوکوک ها به این آنزیم مقاوم ولی میکروکوکها نسبت به آن حساس اند. این تست همچنین می تواند برای تمایز استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*) از دیگر استرپتوکوک های بتاهمولیتیک به کار رود.

c) تست حساسیت به لیزوستافین: (Lysostaphin susceptibility tube test)

لیزوستافین آنزیمی است که دیواره سلولی استافیلوکوکی (پل های عرضی پنتاگلایسینی) را تخریب کرده و باعث لیز سلول های استافیلوکوکی می شود اما میکروکوکها به این آنزیم مقاوم هستند. همچنین برخی از استافیلوکوکها (مانند استاف ارئوس و برخی استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی) نسبت به دیگر استافیلوکوکها (همچون استاف همولیتیکوس و استاف ساپروفیتیکوس) به لیزوستافین حساس ترند. برای انجام این تست، سوسپانسیون غلیظی از ارگانیسم موردنظر را در سالین استریل تهیه کرده و به آن محلول لیزوستافین افزوده می شود. سپس لوله را انکوبه می کنیم. شفاف شدن سوسپانسیون نسبت به لوله کنترل، نشان دهنده حساسیت به لیزوستافین است.

d) تست حساسیت به فوازولیدون: (Susceptibility to furazolidone)

فورازولیدون یک عامل ضد میکروبی است. حساسیت به فورازولیدون توسط دیسک های حاوی 100 µg فورازولیدون تعیین می شود. استافیلوکوکها به فورازولیدون حساس هستند و قطر هاله ای بیش از ۱۵ میلی متر تولید می کنند (≥15 mm). در حالی که میکروکوکها نسبت به آن مقاوم هستند و تنها قطر هاله کوچکی حداکثر تا ۹ میلی متر اطراف کلنی آنها مشاهده می شود.

با سپاس از توجه شما

تهیه کننده:سهیلا عباسی